

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Bioplataformas electroanalíticas versátiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer a diferentes niveles moleculares

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca Magnolia Torrente Rodríguez

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón
Susana Campuzano Ruiz
María Gamella Carballo

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Bioplataformas electroanalíticas versátiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer a diferentes niveles moleculares

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca Magnolia Torrente Rodríguez

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón

Susana Campuzano Ruiz

María Gamella Carballo

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOPLATAFORMAS ELECTROANALÍTICAS VERSÁTILES
PARA DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y FIABLE DE CÁNCER
A DIFERENTES NIVELES MOLECULARES**

Bajo la dirección de los doctores:

José Manuel Pingarrón Carrazón
Catedrático de Universidad (U.C.M.)

Susana Campuzano Ruiz
Profesora Titular (U.C.M.)

María Gamella Carballo
Investigadora (U.C.M.)

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

REBECA MAGNOLIA TORRENTE RODRÍGUEZ

MADRID, 2019



Universidad Complutense de Madrid

Dpto. Química Analítica - Facultad de CC. Químicas - Ciudad Universitaria. 28040 Madrid

Tfno.: 34 913944331

E-mail: depquian@ucm.es

**DOÑA M^a CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado *“Bioplataformas electroanalíticas versátiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer a diferentes niveles moleculares”* ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón**, **Susana Campuzano Ruiz** y **María Gamella Carballo**, profesores e investigadores de dicho departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 15 de febrero de 2019

Fdo. M^aCruz Moreno Bondi

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Susana Campuzano Ruiz

Fdo. María Gamella Carballo

Fdo. Rebeca Magnolia Torrente Rodríguez

ÍNDICE

1. SUMMARY.....	1
1.1. INTRODUCTION	3
1.1.1. CIRCULATING CANCER BIOMARKERS	3
1.1.1.1. CLINICAL RELEVANCE OF BIOMARKERS IN CANCER DIAGNOSIS AND PROGNOSIS	3
1.1.1.2. PROTEIN CANCER BIOMARKERS	3
1.1.1.3. GENETIC CANCER BIOMARKERS: CANCER-RELATED miRNAs	4
1.1.2. ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS: A COMPETITIVE ALTERNATIVE AGAINST CONVENTIONAL METHODOLOGIES FOR DETECTION OF CANCER BIOMARKERS	5
1.1.2.1. ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS.....	6
1.1.2.2. ELECTROCHEMICAL NUCLEIC ACID-BASED BIOSENSORS.....	7
1.1.2.3. INDIVIDUAL VERSUS MULTIPLEXED APPROACHES	7
1.1.3. MAGNETIC MICRO-CARRIERS IN ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS.....	8
1.2. AIMS OF THIS WORK	9
1.3. RESEARCH RESULTS	10
1.3.1. ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS FOR INDIVIDUAL DETERMINATION OF CANCER BIOMARKERS.....	10
1.3.1.1. MBs-BASED BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF PROTEIN BIOMARKERS OF EMERGENT RELEVANCE IN CANCER	10
1.3.1.1.1. FIBRINOGEN IMMUNOSENSOR	10
1.3.1.1.2. ENDOGLIN (CD105) IMMUNOSENSOR	11
1.3.1.1.3. FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 4 (FGFR4) IMMUNOSENSOR	12
1.3.1.1.4. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (HER-2) IMMUNOSENSOR	13
1.3.1.1.5. p53-AUTOANTIBODIES IMMUNOSENSOR.....	13
1.3.1.2. MBs-BASED BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF GENETIC BIOMARKERS: miRNAs	14
1.3.1.2.1. BIOSENSORS BASED ON RNA HYBRIDS-SPECIFIC BIORECEPTORS: VIRAL PROTEINS VERSUS ANTIBODIES.....	14
1.3.1.2.2. BIOSENSORS BASED ON ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION APPROACHES.....	17

1.3.2. <i>ELECTROCHEMICAL STRATEGIES FOR MULTIPLEXED DETERMINATION OF CIRCULATING CANCER BIOMARKERS</i>	18
1.3.2.1. MULTIPLEXED DETERMINATION OF SAME MOLECULAR LEVEL BIOMARKERS	19
1.3.2.2. MULTIPLEXED DETERMINATION OF DIFFERENT MOLECULAR LEVEL BIOMARKERS	21
1.4. SYNTHESIS AND USE OF PRUSSIAN BLUE NANOPARTICLES AND THEIR METAL STRUCTURAL ANALOGUES SUCH AS NANOZYMES WITH INTRINSIC PEROXIDASE ACTIVITY	22
1.5. MILESTONES.....	23
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	27
2.2. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES CIRCULANTES DE CÁNCER. ANTEDECENTES BIBLIOGRÁFICOS	30
2.3. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL.....	70
2.3.1. <i>DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES PROTEICOS</i>	70
2.3.1.1. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO	78
2.3.1.2. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE ENDOGLINA (CD105).....	83
2.3.1.3. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE FGFR4	86
2.3.1.4. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE HER-2.....	88
2.3.1.5. DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS FRENTE A p53	97
2.3.2. <i>DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES GENÉTICOS</i>	104
2.3.2.1. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO BIO-RECEPTORES SELECTIVOS.....	116
2.3.2.2. DETERMINACIÓN DE microRNAs MEDIANTE ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN	129
2.4. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA MULTIDETERMINACIÓN	137
2.4.1. <i>MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE LA MISMA NATURALEZA</i>	139
2.4.2. <i>MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISTINTO NIVEL MOLECULAR</i>	148

3. PARTE EXPERIMENTAL.....	154
3.1 INSTRUMENTACIÓN	156
3.1.1. APARATOS.....	156
3.1.2. ELECTRODOS, CONECTORES Y CARCASAS	157
3.2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS	158
3.2.1. REACTIVOS	158
3.2.2. DISOLUCIONES	165
3.2.3. MUESTRAS	172
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	174
3.3.1. PREPARACIÓN DE BIOPLATAFORMAS AMPEROMÉTRICAS BASADAS EN MBs PARA LA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES CIRCULANTES DE CÁNCER	176
3.3.1.1. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES PROTEICOS.....	176
3.3.1.2. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES GENÉTICOS	182
3.3.1.2.1. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO PROTEÍNAS VIRALES	182
3.3.1.2.2. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS.....	184
3.3.1.2.3. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN ISOTERMAS	185
3.3.2. PREPARACIÓN DE BIOPLATAFORMAS AMPEROMÉTRICAS BASADAS EN MBs PARA LA MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES	186
3.3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS	189
3.3.3.1. DETERMINACIÓN EN UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO.....	190
3.3.3.2. DETERMINACIÓN EN SUERO	190
3.3.3.3. DETERMINACIÓN EN LISADOS CELULARES	191
3.3.3.4. DETERMINACIÓN EN SALIVA.....	193
3.3.3.5. DETERMINACIÓN EN CÉLULA ENTERA	194
3.3.3.6. DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE RNA _t EXTRAÍDO DE LÍNEAS CELULARES, TEJIDOS FRESCOS Y EMBEBIDOS EN PARAFINA Y CITOLOGÍAS MAMARIAS.....	194
3.3.4. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE NATURALEZA PROTEICA EMPLEANDO LA METODOLOGÍA ELISA CONVENCIONAL.....	196

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....199

Parte I. Plataformas electroquímicas para la determinación de biomarcadores de cáncer

4.1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES..... 203

4.1.1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS INMUNOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES PROTEICOS DE RELEVANCIA EMERGENTE.....203

4.1.1.1. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO..... 203

4.1.1.1.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES..... 204

4.1.1.1.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD..... 208

4.1.1.1.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS..... 211

4.1.1.1.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO 213

4.1.1.2. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ENDOGLINA (CD105) 214

4.1.1.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES..... 216

4.1.1.2.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD..... 219

4.1.1.2.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS..... 220

4.1.1.2.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO HUMANO 221

4.1.1.3. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR 4 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFR4)..... 223

4.1.1.3.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES..... 225

4.1.1.3.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD..... 228

4.1.1.3.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS..... 229

4.1.1.3.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE LISADOS CELULARES..... 231

4.1.1.4. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER-2) 234

4.1.1.4.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES..... 236

4.1.1.4.2. CURVA DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS..... 238

4.1.1.4.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS..... 239

4.1.1.4.4. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN EN SUERO, LISADOS CELULARES Y CÉLULA ENTERA 240

4.1.1.5. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS A LA PROTEÍNA p53..... 245

4.1.1.5.1. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD..... 248

4.1.1.5.2. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA 250

4.1.1.5.3. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO HUMANO 251

4.1.2. DESARROLLO DE PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS DE RELEVANCIA EMERGENTE.....	254
4.1.2.1. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO PROTEÍNAS VIRALES	255
4.1.2.1.1. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO UNA PROTEÍNA VIRAL COMO BIO-RECEPTOR DE CAPTURA.....	255
4.1.2.1.1.1. Optimización de variables experimentales.....	257
4.1.2.1.1.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad.....	260
4.1.2.1.1.3. Evaluación de la selectividad de la metodología	262
4.1.2.1.1.4. Aplicación al análisis de RNA _t extraído de células y tejidos.....	264
4.1.2.1.2. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO UNA PROTEÍNA VIRAL COMO ELEMENTO DE DETECCIÓN.....	271
4.1.2.1.2.1. Optimización de variables experimentales.....	273
4.1.2.1.2.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad.....	276
4.1.2.1.2.3. Evaluación de la selectividad de la metodología	279
4.1.2.1.2.4. Aplicación al análisis de RNA _t extraído de células y tejidos.....	282
4.1.2.2. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS	285
4.1.2.2.1. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS COMO BIO-RECEPTORES DE CAPTURA	285
4.1.2.2.1.1. Optimización de variables experimentales.....	288
4.1.2.2.1.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad.....	292
4.1.2.2.1.3. Evaluación de la selectividad de la metodología	295
4.1.2.2.1.4. Aplicación al análisis de RNA _t extraído de células y tejidos.....	296
4.1.2.2.2. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS COMO ELEMENTOS DE DETECCIÓN.....	305
4.1.2.2.2.1. Optimización de variables experimentales.....	306
4.1.2.2.2.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad.....	309
4.1.2.2.2.3. Evaluación de la selectividad de la metodología	312
4.1.2.2.2.4. Aplicación al análisis de muestras de RNA _t extraído de células y tejidos	313
4.1.2.3. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN BASADAS EN REACCIONES DE HIBRIDACIÓN EN CADENA (HCR)	317
4.1.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.....	321
4.1.2.3.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD.....	324
4.1.2.3.3. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA	326
4.1.2.3.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA _t EXTRAÍDO DE CÉLULAS Y TEJIDOS	327

4.2. PLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES 329

4.2.1. PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE LA MISMA NATURALEZA: *microRNAs* 329

4.2.1.1. BIOSENSORES BASADOS EN PROTEÍNAS VIRALES 330

4.2.1.1.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES 331

4.2.1.1.2. EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA EN LA DETECCIÓN DE AMBOS BIOMARCADORES 331

4.2.1.1.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS 332

4.2.1.1.4. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA 334

4.2.1.1.5. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA_t 335

4.2.1.2. BIOSENSORES BASADOS EN ANTICUERPOS SELECTIVOS 338

4.2.1.2.1. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA_t 340

4.2.2. PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISTINTA NATURALEZA: PROTEÍNA INTERLEUCINA-8 (IL-8) Y SU RNA MENSAJERO ASOCIADO (*mRNA*) 341

4.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES 343

4.2.2.2. EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA EN LA DETECCIÓN DE AMBOS BIOMARCADORES 347

4.2.2.3. CURVAS DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD 348

4.2.2.4. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA 350

4.2.2.5. APLICACIÓN AL ANÁLISIS EN SALIVA 352

Parte II. Nanopartículas metálicas como enzimas artificiales

4.3. SÍNTESIS Y EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE PRUSIA (PBNPs) Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES METÁLICOS COMO NANOZIMAS CON ACTIVIDAD PEROXIDASA INTRÍNSECA 357

4.3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE PBNPs Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES METÁLICOS 359

4.3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PBNPs Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES EN PROCESOS OXIDATIVOS RELEVANTES 362

5. CONCLUSIONS.....	375
6. BIBLIOGRAFÍA	379
7. RESUMEN EN INGLÉS.....	418
7.1. INTRODUCTION.....	420
7.2. AIMS OF THIS WORK	420
7.3. RESEARCH RESULTS.....	421
7.4. MILESTONES.....	422
8. RESUMEN EN ESPAÑOL	424
8.1. INTRODUCCIÓN	426
8.2. OBJETIVOS	426
8.3. RESULTADOS	427
8.4. LOGROS.....	428
9. DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS.....	430
10. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	449
11. PUBLICACIONES DERIVADAS/PUBLISHED PAPERS	461

1. SUMMARY

1.1. INTRODUCTION

1.1.1. CIRCULATING CANCER BIOMARKERS

1.1.1.1. CLINICAL RELEVANCE OF BIOMARKERS IN CANCER DIAGNOSIS AND PROGNOSIS

Cancer biomarkers are defined as biological substances of different molecular level that are mainly produced by tumor cells and can be detected in solid samples, liquid biopsies, and different body fluids. They are considered as excellent disease's indicators for early diagnosis, cancer characterization/monitoring and prediction of therapeutic responses, providing a better understanding and an accurate and dynamic snapshot of the cancer pathogenesis in a reasonable time frame.

The wide variety of cancer reporters in a great diversity of clinical specimens, showing altered expression levels depending on specific clinical features, could ultimately depict the unique and precise molecular pattern of the malignancy, therefore, allowing the most effective therapy strategy to be implemented by the specialists in each particular case.

The vast information that is released from tumor-related biomarkers reflects the biochemical properties of cancer cells as well as of the tumor mass surroundings, which ratifies the undeniable diagnostic, prognostic and therapeutic value of these molecular reporters whose early monitorization may be one step ahead of tumor spread with no backward movement.

1.1.1.2. PROTEIN CANCER BIOMARKERS

Every biological process that takes place in our cells and tissues microenvironment is reflected in our proteome, which contains all the information regarding the entire group of proteins expressed and modified in cells, tissues or specific organs at any time and under specific conditions.

Cancer cells release a huge variety of proteins with specific altered expression levels depending on the state of the disease, therefore, being able to discriminate, classify and reveal clinical ongoing between healthy individuals and cancer-related patients.

Some of the most relevant protein-based cancer biomarkers accepted by FDA and usually employed for the clinical diagnosis and prognosis of neoplastic diseases, include estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, HER-2 neu, CA15-3 and CA27.29 for breast cancer, free PSA and p63 protein for prostate cancer, and CA-125, OVA1 and HE4 for ovarian cancer. However, taking into consideration that cancer exists in more than 200 subtypes, new sensitive and selective protein biomarkers with potential clinical utility and diagnostic and prognostic validity for monitoring of other types of cancer are urgently demanded.

1.1.1.3. GENETIC CANCER BIOMARKERS: CANCER-RELATED miRNAs

Although most of the conventional techniques employed for cancer diagnosis are based on the determination of the expression level of protein biomarkers, microRNAs (miRNAs) have emerged as one of the most promising biomarkers of genetic molecular subtype, whose misregulation is often causally associated with human diseases. Expression levels of these highly conserved, small (sizes in the range of 19–22 nts), regulatory, single-stranded, endogenous and non-coding RNA molecules, usually located in regions of chromosomes, have demonstrated to be accurate indicators of highly utility for clinical monitoring of cancer and other diseases. Their specific expression profiles in cancer cells, tumor tissues and body fluids depict the absence, presence, molecular status and response to an applied treatment of a given specific disease.

Biogenesis and processing of these small RNAs occurs in the nucleus of the cell through complex mechanisms involving different proteins and enzymes. According to their specific role, miRNAs can be classified as oncogenes and tumor suppressors, depending on whether they inhibit tumor suppressor or oncogenic genes, respectively, revealing the direct association between neoplastic diseases and miRNAs regulation.

MiRNAs with oncogenic role, also known as “oncomiRs”, are significantly overexpressed in several human cancers due to altered epigenetic mechanisms and deregulation at transcriptional levels, promoting tumor development by downregulating the expression of suppressor tumor genes. Among all identified oncomiRs, miRNA-21 is considered one of the most well-studied being involved in invasion and migration processes and showing increased level of expression in tumor tissues compared to healthy ones. On the contrary, tumor suppressor miRNAs can inhibit tumorigenic events by repressing genes with

oncogenic role, being let-7, miRNA-17-5p, miRNA-29, miRNA-127 and miRNA-205 some of the most common examples.

Regarding breast cancer, miRNA-21 and miRNA-205 are especially relevant from a molecular point of view of the disease. MiRNA-21 acts as a non-specific oncomiR while miRNA-205 acts as a specific tumor suppressor miRNA whose expression patterns highly correlate with short-term disease-free intervals and can accurately discriminate between different molecular breast cancer subtypes.

Therefore, due to the high correlation found between miRNAs expression profiles and cancer progression, these molecules are considered one of the most promising diagnostic and prognostic biomarkers which can be detected even in the earliest stages of the disease by the practice of non-or minimally invasive biopsies, showing their abilities as early and reliable predictors in a wide variety of highly accessible biological specimens.

1.1.2. ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS: A COMPETITIVE ALTERNATIVE AGAINST CONVENTIONAL METHODOLOGIES FOR DETECTION OF CANCER BIOMARKERS

Among the most conventional and available methodologies, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemistry (IHC), flow cytometry, protein-based microarrays, mass spectrometry and qRT-PCR, gene-based microarrays, In Situ Hybridization (ISH) and next generation sequencing (NGS), are some examples that can be included for the detection of protein and gene-related cancer biomarkers, respectively. All of these techniques are scarcely applicable as routine testing devices mainly due to their high complexity, substantial amount of sample required, high dimensions and low throughput. In this context, electrochemical biosensors are presented as highly promising alternatives to these methodologies. Due to their excellent intrinsic properties such as miniaturization, fast response, cost-effectiveness, compatibility with advanced microfabrication technology, high versatility for combining with all types of nanomaterials and biological species, and multiplexed capabilities, electrochemical biosensors satisfy the requirements and basic fundamentals demanded by point of care testing (POCT) devices for decentralized clinical applications.

Affinity-based biosensors whose fundamental relies on the use of biospecific ligands including antibodies, enzymes, nucleic acids and proteins, are characterized by showing high intrinsic selectivity in the molecular recognition event of the specific target and therefore, are commonly used as one of the most promising and powerful tools for cancer diagnosis and prognosis. These highly selective and versatile bioreceptors, which can be easily coupled to any type of material of both micro- and nano-scale, display excellent performance in the detection of any kind of circulating cancer biomarkers such as proteins, genes, circulating tumor cells (CTCs) and exosomes, among others, thanks to the combination between their high selectivity and the intrinsic sensitivity offered by the electrochemical transduction techniques.

Electrochemical biosensors are playing an important role in the field of clinical analysis, as they are fast, low cost and allow the accurate individual or multiplexed determination of targets of different molecular level in challenging samples after minimal treatments and using quite simple and straightforward protocols. Additionally, screen-printed technology allows the incorporation of working, counter and reference electrodes in the same device, introducing important benefits compare to conventional electrochemical transducers in terms of reproducibility, mass fabrication, cost-effectiveness, disposability, planar configuration and required sample volume, allowing an intimate contact between modified transducer and target analyte of interest contained in the sample.

1.1.2.1. ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS

Affinity biosensors based on antibodies as biological receptors (immunosensors) have been widely employed as electrochemical devices for detection and monitoring of cancer biomarkers of protein level in all types of biological specimens. The strong efficiency and selectivity that characterize the immunocomplex formation involving antigen–antibody (Ag–Ab) binding make it possible to develop different types of strategies for detecting a wide variety of antigens and/or antibodies of interest based on different configuration assays. Moreover, structural characteristics of proteins and immunoglobulins enable the easy modification of these affinity receptors with different types of chemicals, linkers and nanostructures for their successful immobilization on solid surfaces as well as their convenient labelling for acting as detector bioreceptors when required.

The excellent capabilities of immunosensing -based strategies combined with electrochemical detection techniques have been widely used along years due to their potential application for the sensitive and selective analysis of high relevance protein targets in different fields, including food industry, environmental pollutant analysis, foodborne pathogens, bioterrorism and clinical diagnostics, among others.

1.1.2.2. ELECTROCHEMICAL NUCLEIC ACID-BASED BIOSENSORS

The fundamental of nucleic acid-based biosensors relies on hybridization processes between target and probe oligonucleotides as a result of base complementarity between both sequences. These affinity biosensors consist of the immobilization of the probe sequence on the surface of the solid support for the effective recognition of the complementary target, being the hybridization event finally monitored as a consequence of any change that can be measured by coupling to an electrochemical transducer.

Although typically the most conventional nucleic acid-based biosensors are those involving DNA–DNA interactions, the discovery of miRNAs and their critical regulatory roles in development and progress of diseases has triggered the technology of biosensors based on RNAs, gaining much attention especially in cancer diagnosis and prognosis, due to their specificity and easily accessible nature. In this regard, electrochemical biosensors for miRNAs determination are emerging as one of the most potential diagnostic tools for cancer monitoring, as they present several important advantages such as fast response, simple instrumentation, low cost and low sample amount required.

1.1.2.3. INDIVIDUAL *VERSUS* MULTIPLEXED APPROACHES

Conversion from healthy to pathological states involves a huge amount of complex biological transformations characterized by uncontrolled synthesis, expression and biological behavior of proteins, genes, and other types of signaling biomarkers.

Although analysis of single biomarkers can be used to diagnose health-related disorders, it has been widely demonstrated that one specific biomarker can be associated with development of several diseases. Therefore, individual detection of biomarkers is not useful enough for accurate and specific disease monitoring. On the contrary, multiplexed

platforms, able to simultaneously measure several biomarkers at the same time, are presented as one of the most adequate options for improving the reliability in the clinical diagnosis and prognosis. In addition, it is easy to integrate these multiplexed bioscaffolds in portable instrumentation that can provide a clinical snapshot image of the patient's health status to the specialist, thus making it possible to select the most suitable therapeutic decisions in each specific case.

Point of care (POC) technology offers potential improvements in the management of diseases and health conditions at the primary care level, as well as in decentralized, remote and resource-limited settings. In this scenario, multiplexed electrochemical biosensors play a very important role in the development of this type of medical devices as a result of their miniaturization capabilities and competitive sensitivity. The appropriated combination of multianalyte platforms based on electrochemical detection and high selective recognition entities in conjunction with all types of nanomaterials can be successfully employed for development of robust, efficient and powerful electrochemical POC devices with potential applications in real-life healthcare situations, becoming available for users and reaching the market in a nearly future.

1.1.3. MAGNETIC MICRO-CARRIERS IN ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS

Among all variables directly affecting to the ultimate analytical performance of biosensors, proper and oriented immobilization of biological receptors on solid surfaces is critical in order to develop biosensing devices displaying satisfactory sensitivity for expected real applications.

Due to their high surface area and magnetic properties, magnetic beads (MBs) are considered as suitable and convenient supports for immobilization, separation and concentration of many types of molecular entities in a reproducible and efficient manner, thus triggering the fabrication and performance of a tremendous amount of biosensing approaches with potential applications in different scientific disciplines, resulting in easy-to-develop analytical designs able to efficiently operate in reduced assay time, with minimal matrix effects and improved detection limits. All these interesting features made MBs-based

biosensing approaches a very attractive alternative compared to the methodologies developed directly on the transducer surface in a static way (integrated bioplatforms).

Therefore, the benefits associated to the employment of MBs along with the high sensitivity offered by electrochemical techniques can be easily combined for the fabrication of biosensing devices for the accurate determination of different cancer-related reporters at the required ultra-low concentration ranges in complex biological matrices.

1.2. AIMS OF THIS WORK

The main aims of this work include the design, development and real application of novel bioelectrochemical platforms for single and multiplexed interrogation of high relevant circulating cancer biomarkers in biological matrices and clinical specimens, with attractive capabilities as POCT devices for rapid diagnostics and cancer monitoring.

The strategies developed along this PhD Thesis have been successfully applied to the analysis of the selected biomarkers in minimally invasive samples such as serum, plasma and saliva, as well as in entire cells, cell lysates and tissues (both fresh and paraffin-embedded). The obtained results were validated by its comparison with those provided by appropriated standard methodologies and with those reported in literature by other authors employing different and convenient analytical methods.

In order to achieve the proposed goals, different biological entities were efficiently immobilized on the surface of commercial MBs followed by the molecular biorecognition reaction involving the target analyte and detector biomolecules, conveniently labeled with horseradish peroxidase (HRP). The electrochemical detection of the enzyme product was carried out after capturing the modified MBs on the surface of disposable screen-printed electrodes (SPE), using hydroquinone (HQ) as redox mediator and hydrogen peroxide (H_2O_2) as enzymatic substrate. The variation in the cathodic response attributed to the enzymatic reduction of H_2O_2 mediated by HQ obtained by amperometry at -0.2 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) was used as transduction signal.

1.3. RESEARCH RESULTS

All the research results presented in this PhD Thesis demonstrated the successful development of electrochemical bioplatfroms based on the use of MBs for single and multiplexed accurate detection of circulating cancer-related biomarkers in clinical matrices from different sources.

Selection of convenient affinity bioreceptors (antibodies, affinity binding proteins, protein antigens and DNA and RNA probes) along with the most suitable immobilization strategies in each case, allowed the correct design and successful development of novel and elegant biosensing devices with the appropriate sensitivity and specificity required in clinical diagnostic fields for the simple, fast and accurate analysis of disease-related biomarkers in minimally or non-invasive samples.

1.3.1. ELECTROCHEMICAL AFFINITY BIOSENSORS FOR INDIVIDUAL DETERMINATION OF CANCER BIOMARKERS

This section summarizes the most relevant research results obtained with the developed electrochemical bioplatfroms based on highly specific affinity bioreceptors against proteins and target genes, prepared on MBs for the detection of single biomarkers.

1.3.1.1. MBs-BASED BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF PROTEIN BIOMARKERS OF EMERGENT RELEVANCE IN CANCER

1.3.1.1.1. FIBRINOGEN IMMUNOSENSOR

A disposable indirect competitive electrochemical immunosensor based on streptavidin functionalized magnetic beads (Strep-MBs), biotinylated fibrinogen (biotin-Fbg) and screen-printed carbon electrodes (SPCEs) has been developed for determination of free fibrinogen (Fbg) in an international standard plasma sample containing a certified amount of the target protein.

The configuration of the assay was based on the competition between the free Fbg contained in the sample and biotin-Fbg immobilized on the surface of Strep-MBs for the free binding sites of a fixed concentration of a specific anti-Fbg antibody conjugated to the enzyme

HRP. In this particular approach and, as typically occurs in the indirect-based competitive assays, the amperometric signal, obtained as described above, is inversely proportional to the concentration of free Fbg in the sample.

The limit of detection (LOD) and relative standard deviation (RSD) of the amperometric responses achieved with the developed methodology (0.8 ng mL^{-1} and 3.0 %, respectively), demonstrated the high sensitivity and reliability of the whole procedure.

Cross-reactivity in the presence of potential interferents was also evaluated and, interestingly, even though the response of the biosensor was significantly lower in the presence of D-Dimer, human IgG and heparine, the accurate determination of the target protein in real samples was still feasible.

Additionally, the stability of both types of bio-complexes including biotin-Fbg-Strep-MBs and HRP-anti-Fbg-biotin-Fbg-Strep-MBs was evaluated by storing them in filtered buffer at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The results showed that both immunoconjugates could be stored up to 50 days without significant loss of sensitivity, highlighting that it is possible to perform the amperometric detection in decentralized settings, if needed.

1.3.1.1.2. ENDOGLIN (CD105) IMMUNOSENSOR

A novel and disposable sandwich-based immunosensor was prepared for the rapid, sensitive and accurate determination of endogenous concentration of endoglin (CD105) biomarker in real serum samples. The developed methodology involved the covalent immobilization of anti-CD105 antibodies on previously activated carboxylic MBs (HOOC-MBs) with the EDC-Sulfo-NHS chemistry, followed by the molecular recognition of the target biomarker previously labeled with HRP conjugated anti-CD105 antibodies by means of just one incubation step.

The dynamic range obtained with the developed strategy ($0.8\text{--}10.0 \text{ ng mL}^{-1}$), the LOD (0.2 ng mL^{-1}), which was 4.5 times lower compared to that one from the only electrochemical immunosensor for CD105 determination reported until the development of this one, and the low value for RSD achieved (3.6 %), allowed the successful application of the proposed methodology for the determination of CD105 in real human serum samples after just a convenient dilution and in 30 minutes.

The high selectivity offered by the methodology was confirmed against potential interferences commonly found in human serum. Moreover, the high stability of the anti-CD105-MBs conjugates, stored at 4 °C in filtered buffer, provided sensitive responses for the target protein determination for at least 30 days, enabling the possibility of preparing the conjugates and carrying them to the corresponding location in order to perform *in situ* detection, if required.

1.3.1.1.3. FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 4 (FGFR4) IMMUNOSENSOR

A fast, sensitive and selective electrochemical biosensor for determination of Fibroblast Growth Receptor 4 (FGFR4) biomarker in different cell lysates has been developed for the first time. The proposed immunosensor was based on a sandwich format assay prepared on HOOC-MBs activated through EDC-Sulfo-NHS chemistry, and subsequently modified with anti-FGFR4 specific antibodies for the selective capture of the target protein, which is finally sandwiched and labeled with biotin-anti-FGFR4 antibodies and Streptavidin-HRP (Strep-HRP) conjugate, respectively.

The remarkable selectivity, sensitivity (LOD = 48.2 pg mL⁻¹) and reproducibility (RSD = 4.4 %), satisfied the analytical and clinical requirements for the quantification of this target biomarker in the selected samples. Therefore, the developed methodology was adequately applied to the determination of the endogenous content of FGFR4 in raw cell lysates from breast, colon and pancreatic cancer, displaying different expression levels of the target protein, by just requiring as low as 2.5 µg of sample and in just 15 minutes. The quantitative and qualitative comparison of the obtained results with the proposed biosensor and those provided by ELISA and Western Blot techniques was also carried out, proving the great feasibility of the developed immunosensor for the accurate determination of FGFR4 in the selected samples in a presumably simple manner.

Moreover, the stability of the anti-FGFR4-MBs bioconjugates was evaluated (storing them at 4 °C in filtered buffer) providing amperometric measurements inside the control limits for two weeks. These results supported the possibility of preparing and storing the bioconjugates until the analysis is required either in centralized or decentralized settings.

1.3.1.1.4. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (HER-2) IMMUNOSENSOR

A highly sensitive and accurate amperometric methodology with demonstrated real applicability in serum, cell lysates and, for the first time using an electrochemical biosensor, in intact breast cancer cells, has been developed for the determination of one of the most well-established breast cancer biomarkers, HER-2. The assay consisted of the covalent binding of anti-HER-2 specific antibodies onto activated HOOC-MBs for the selective capture of target HER-2. HRP-anti-HER-2-antibodies were used after antigen capture as a detection antibody in order to develop a sandwich assay configuration.

The remarkable analytical characteristics obtained with the developed immunosensor ($DR = 0.1\text{--}32.0 \text{ ng mL}^{-1}$; $LOD = 26 \text{ pg mL}^{-1}$) and the great reproducibility of the bioplatfrom fabrication ($RSD = 5.6 \%$), together with the high selectivity against different non-target proteins, allowed the successful determination of HER-2 in human serum samples, raw cell lysates and cell lysate mixtures expressing different levels of the target biomarker, as well as in different intact breast cancer cells. In addition, the developed methodology allowed the discrimination between positive and negative breast cancer cells according to the level of expression of HER-2. The excellent results achieved in the great variety of clinical samples assayed, placed the developed strategy as an extremely useful and promising analytical tool for breast cancer diagnostics adaptable to clinical samples ranging from the simpler to the highly complex nature with great analytical performance.

1.3.1.1.5. p53-AUTOANTIBODIES IMMUNOSENSOR

A disposable amperometric biosensor that combines in a pioneer manner the use of HaloTag-magnetic microcarriers functionalized with HaloTag fusion p53 protein, has been developed for the specific captured of serum p53-autoantibodies that were subsequently reacted with HRP-anti-IgG specific antibodies, based on the one step-*in vitro* and *in situ* expression of the C-terminal tagged HaloTag p53 protein directly on the surface of Halo Tag-MBs.

The developed electrochemical platform showed a linear response between the amperometric signals and increased concentration of p53 autoantibodies in the range of $1.1\text{--}5.0 \text{ U mL}^{-1}$, reaching a LOD of 0.34 U mL^{-1} , far below the cut-off value established by commercial ELISA kits for discrimination between positive and negative p53 autoantibodies

in serum samples (120 U mL^{-1}), and a RSD value of 6.2 %. The obtained analytical features allowed the real application of the developed immunoplatforms, which offered a 440 times higher sensitivity compared to the conventional ELISA methodology and in just 1.5 hours, for the analysis of human serum samples collected from both high risk of developing and already diagnosed colorectal and ovarian cancer patients.

Moreover, the versatility and selectivity of the methodology was demonstrated by immobilizing different HaloTag fusion proteins to MBs, thus confirming the possibility of easily translating this methodology to the determination of autoantibodies specific to other proteins without particular optimization of parameters and therefore the potential to develop a platform for the screening of humoral immune response in cancer patients through multiplexed electrochemical determination of autoantibodies against different tumor associated antigens.

1.3.1.2. MBs-BASED BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF GENETIC BIOMARKERS: miRNAs

Taking into consideration the undeniable association between deregulation of miRNAs and development of pathological states and several diseases, the detection and determination of these small non-coding RNA molecules, is, undoubtedly, crucial for the diagnosis, prognosis and monitoring of cancer.

The suitable characteristics and properties offered by electrochemical detection methodologies along with the advantages of MBs, used as solid supports for the development of the proposed analytical approaches, as well as different amplification strategies selected, meet the demanded requirements for the highly sensitive and selective detection tools for this regulatory tiny biomarkers in a wide variety of clinical and biological samples, as it will be demonstrated along this PhD Thesis.

1.3.1.2.1. BIOSENSORS BASED ON RNA HYBRIDS-SPECIFIC BIORECEPTORS: VIRAL PROTEINS *VERSUS* ANTIBODIES

Several amperometric strategies based on viral proteins and specific antibodies against RNA–RNA and DNA–RNA hybrids, respectively, have been developed for the sensitive and selective detection of high relevant cancer-related miRNAs in raw RNA_t extracts from cell

lines, fresh and paraffin embedded human tissues, and breast cytologies, without requiring any additional amplification, pre-enrichment or complex pre-treatments steps.

The first set of results involved the use of a viral protein, p19 binding protein, which presents high selectivity and specificity in a size dependent manner for 19–21 nts RNA homoduplexes, both as capture and detector affinity receptor, immobilized on Chitin- and Streptavidin-modified magnetic beads, respectively (Chitin-MBs, Strep-MBs). In this context, the selective and sensitive determination of the non-specific breast cancer oncogene miRNA-21 was carried out by using p19 protein as specific receptor, complementary biotinylated RNA sequences and Streptavidin-HRP conjugates or HRP-anti-MBP antibody against the maltose binding protein (MBP) domain of the p19 protein as enzymatic label, respectively.

Once optimized the experimental conditions, the developed strategies based on p19 protein as capture and detector bioreceptor yielded LOD and RSD values of 0.04 nM and 3.7 %, and 0.42 nM and 5.4 %, respectively, thus demonstrating the adequate sensitivity and reliability of the methodologies and therefore, making it possible to carry out the detection of the target miRNA-21 in raw RNA_t extracted from breast cancer cells as well as from fresh and formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) human tumor tissues and breast cytology specimens, by using only 500 and 1000 ng of RNA_t, respectively. The results obtained with both strategies confirmed the expected overexpression of the oncogene miRNA-21 in all breast cancer cells and tumor tissues, revealing the extraordinary ability of the proposed biosensors to discriminate up-regulated mature miRNAs levels from normal levels in a rapid and easy manner.

Selectivity against fully non-complementary (NC) and 1-mismatched (1-m) target sequences was evaluated with both methodologies, displaying great and acceptable discrimination in the presence of NC miRNAs and 1-m miRNA-21 target sequences with a single base mismatch centrally located, respectively. This latter was significantly improved by performing RNA–RNA duplex formation at higher hybridization temperature and in the presence of real sample matrices containing a huge amount of other NC miRNAs. Additionally, the use of p19-Chitin-MBs conjugates that could be prepared and stored at 4 °C for as long as 45 days, open the possibility of performing the detection of the target miRNA in decentralized settings, if needed.

The second set of results consisted of using high specific commercial antibodies able to selectively scavenged DNA–RNA duplexes in a sequence and size independent manner. In this regard, S9.6 antibody has been successfully employed as both capture and detector affinity bioreceptor in order to develop highly sensitive and selective novel disposable electrochemical bioplatfroms for the detection of cancer-related miRNAs.

By playing the role as capture receptor, S9.6 antibodies were immobilized on the surface of protein G functionalized MBs (ProtG-MBs), by means of the high affinity existing between bacterial protein G and the Fc region of mammalian specific antibodies. The resulting S9.6-ProtG-MBs conjugates selectively captured the DNA–RNA heterohybrids previously formed in solution after the incubation between the target miRNA and its corresponding biotinylated complementary DNA sequence, followed by the enzymatic label of the DNA–RNA duplexes with the Strep-HRP enzymatic polymer.

On the other hand, S9.6 antibody was used also as detector bioreceptor. After the modification of Strep-MBs with the biotinylated complementary DNA sequence, target miRNA was efficiently captured on the surface of the modified MBs and simultaneously labeled with S9.6 antibodies previously conjugated to ProtA-poly-HRP40 enzymatic polymer, again by means of the high binding affinity between Protein A (ProtA) and the Fc region of the S9.6 antibody. In this case, the smart combination between specific S9.6 antibodies and enzymatic conjugates containing a huge number of HRP moieties allowed signal amplification and therefore, a significant improvement of the sensitivity of the proposed methodology, which can be also modulated by the strategical elongation of the complementary DNA sequence.

These novel methodologies stand out due to their simplicity, rapidity of fabrication with great reproducibility (RSD = 3.1 %) and the possibility to operate with great efficiency and in a shorter time than the standard methodologies. These characteristics along with the reached LODs in the lower range of pM, allowed successfully implementing the developed platforms for the sensitive determination of breast cancer-related miRNAs with remarkable selectivity even against mismatched sequences, in raw RNA_t extracts from cell lines and from fresh and FFPE human tumor tissues associated to different breast cancer subtypes according to the HER-2 status, with no need of additional amplification and pre-concentration steps and using sample amounts ranging from 250 to 1000 ng RNA_t.

Moreover, taking into account the high diagnostic value of the multi-analyte determination, the ProtG-MBs-based methodology was extended to the individual analysis of other well-described breast cancer oncogenic miRNAs in raw RNA_t extracted from human tissues, highlighting the extraordinary reliability and flexibility of the developed electrochemical bioplatfrom able to operate in a very accurate and sensitive manner even in complex clinical samples.

In conclusion, the developed methodologies involving the use of commercial viral proteins and antibodies with great selectivity against RNA–RNA and DNA–RNA hybrids, respectively, as both capture and detector affinity bioreceptors, can be easily translated to the detection of any miRNA just by using the appropriate complementary synthetic probe. The developed platforms showed adequate analytical performances for the analysis of mature miRNAs in complex biological samples reflecting substantial benefits compared to the conventional methodologies, through the elegant combination of the intrinsic efficiency of hybridization events, the inherent selective recognition capabilities of proteins and antibodies, the excellent analytical advantages offered by MBs and the high sensitivity associated to the electrochemical detection techniques.

1.3.1.2.2. BIOSENSORS BASED ON ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION APPROACHES

By exploiting the complementarity and the base pairing processes among oligonucleotides sequences, a wide variety of sensitive methodologies based on Hybridization Chain Reaction (HCR), which is a very attractive, enzyme-free, rapid and room temperature nucleic acid amplification strategy involving ingenious hybridization rounds that ultimately trigger the amplification of the analytical signal recorded due to the presence of small concentration of the target gene, have been developed.

A disposable, sensitive, rapid and selective HCR-based electrochemical platform combining the use of Strep-MBs and this amplification strategy, which by its isothermal nature is much easier to implement in POC devices than conventional PCR, for accurate determination of mature miRNA-21 in raw RNA_t extracted from cell lines and breast tumor tissues has been developed for the first time.

The proposed electrochemical bioplatfrom consisted of three main steps, including the immobilization of biotinylated DNA capture probe (b-Cp) on the surface of Strep-MBs, incubation with mixtures containing the target miRNA and fixed amounts of DNA detector probes (Dp) and auxiliary biotinylated DNA hairpin probes (b-H₁ and b-H₂), and the enzymatic label of the resulting HCR-amplified DNA product with Strep-HRP polymer. Thanks to the reasonable design of the oligonucleotide sequences involved in the proposed strategy, sequential hybridization processes occurred as a consequence of the HCR in the presence of the selected target miRNA, yielding a long and amplified DNA duplex containing a wide amount of biotin moieties which are ultimately labeled with Strep-HRP, thus provoking the enhancement of the electrochemical signal recorded.

The RSD value and LOD obtained with the proposed methodology, 5.0 % and 0.06 nM, respectively, were well suited for the rapid analysis of miRNA-21 in raw RNA_t extracts from breast cancer cell lines and fresh human tissues in the absence of any other amplification and/or pre-enrichment additional steps, obtaining once again and as expected, a clear overexpression of the target miRNA-21 in tumor tissues and breast cancer cells, compared to the expression levels observed in normal tissues and non-tumorigenic cells, respectively.

Moreover, the fully discrimination against NC target miRNAs as well as the acceptable selectivity against 1-m miRNAs sequences, along with the fact that it was possible to storage the b-DNA-Strep-MBs conjugates for 15 days with no change in sensitivity, demonstrated the selectivity and stability of the developed approach.

1.3.2. ELECTROCHEMICAL STRATEGIES FOR MULTIPLEXED DETERMINATION OF CIRCULATING CANCER BIOMARKERS

Taking into account the molecular complexity and heterogeneity of human carcinogenesis, in most cases single circulating biomarkers lack the required analytical sensitivity and specificity for elaborating concise and accurate diagnosis and prognosis related to any pathological state or malignancy. Therefore, there is a growing need for the design, development and real implementation of simple and feasible analytical tools applicable to the multiplexed analysis of circulating cancer reporters (from both protein and gene molecular level) in a wide range of clinical samples, biological specimens and minimally invasive bodily fluids.

This section summarizes the procedures and most relevant results obtained by using electrochemical strategies developed for the multiplexed analysis of circulating breast and oral-cancer related biomarkers from the same (miRNAs) and different (protein and the corresponding associated messenger RNA) molecular level, respectively, mainly involving the use of selective affinity bioreceptors (viral proteins, antibodies and DNA probes), commercial MBs and dual screen printed carbon electrodes (SPdCEs) as electrochemical transducers.

1.3.2.1. MULTIPLEXED DETERMINATION OF SAME MOLECULAR LEVEL BIOMARKERS

Although most of the multiplexed methodologies reported so far are based on the simultaneous detection of biomarkers from protein level, in the last years there were significant evidences regarding the high correlation between miRNAs aberrations and the onset and progression of various types of cancer.

One of the main problems regarding diagnosis, prognosis and therapy of breast cancer patients, that can be also translated to other neoplastic diseases, is the fact that sometimes the biological features that are routinely used for classification of these kind of patients, remain limited, since patients with similar breast cancer subtype show different clinical outcomes. In this context, circulating miRNAs profiling appears as one of the most promising solution to solve this issue by providing additional and extremely helpful data which complement the information derived by conventional methodologies allowing a more accurate cancer patients stratification.

By exploiting the extraordinary biological characteristics offered by viral proteins and selective antibodies as capture affinity receptors for the specific detection of miRNAs, two different multiplexed electrochemical approaches for the simultaneous interrogation of two of the most relevant breast cancer-related miRNAs (the non-specific oncogene miRNA-21 and the specific tumor suppressor miRNA-205) in RNA_t raw extracts from breast cancer cell lines and tumor tissues have been developed.

Two different methodologies that involved the effective immobilization of p19 protein and S9.6 antibodies on the surface of Chitin-MBs and ProtG-MBs through the CBD of the p19 protein and the high affinity between bacterial ProtG and Fc region of the S9.6 antibody, respectively were developed for the selective capture of the corresponding RNA hybrids (b-anti-miRNA/miRNA or b-DNA-miRNA) previously formed in solution by homogeneous

hybridization of the target miRNA with the respective RNA or DNA complementary synthetic sequence in each case, and further labeling of the biotinylated RNA hybrid attached to the MBs with the Strep-HRP conjugate.

After the preparation of the modified-MBs batches according to the experimental protocol previously established for the individual methodology, both strategies were successfully applied to the simultaneous detection of miRNA-21 and miRNA-205 in raw RNA_t extracts from breast cancer cell lines and human tumor tissues, showing excellent selectivity against different NC miRNAs as well as an acceptable discrimination for 1-m target sequences, and reliable determination of both target miRNAs in a single experiment.

By using the p19-Chitin-MBs-based strategy, a high reliability regarding MBs modification, affinity biological reactions and simultaneous amperometric detection was demonstrated by the obtained RSD values, 6.3 and 6.4 % for miRNA-21 and miRNA-205, respectively. In addition, the reached LDs (0.61 and 0.62 nM for miRNA-21 and miRNA-205, respectively) were low enough for the accurate detection of both miRNAs in the selected clinical specimens.

The real application of both methodologies, able to discriminate between different mature miRNAs showing up- and down-regulated levels of expression in real clinical samples of high complexity, in a rapid manner (~2 hours) and by requiring as low as 500 ng of RNA_t extract without amplification and/or complex target labels processes, provided results in agreement with those obtained with the single-based strategy and with those reported by other authors employing different detection methodologies.

It is also important to highlight that, although these platforms were applied to the simultaneous detection of only two breast cancer-related miRNAs, due to their robustness and versatility, both strategies can be easily translated to the multi-miRNAs profiling just by the proper selection of the complementary RNA and DNA sequences required for the corresponded hybrid formation, and by the employment of electrochemical platforms comprising as many transducer surfaces as target miRNAs must be determined.

1.3.2.2. MULTIPLEXED DETERMINATION OF DIFFERENT MOLECULAR LEVEL BIOMARKERS

One of the most important key factors for a full comprehension of health and pathological states relies on the profound knowledge related to transcriptional and proteomic mechanisms. Therefore, the simultaneous interrogation of both genetic and proteins biomarkers could provide a more define and sharply molecular snapshot of the clinical outcomes from specific patients and hence, the most convenient and personalized therapy treatments to be applied in each specific case.

With this purpose a disposable electrochemical platform for the simultaneous detection of the protein IL-8 and its associated messenger RNA (IL-8 mRNA), whose salivary expression levels can accurately discriminate between oral cancer patients and healthy subjects, has been developed involving the use of HOOC-MBs and Strep-MBs, specific antibodies against IL-8 protein, hairpin and fully complementary DNA sequences against IL-8 mRNA target, and Strep-HRP conjugate as enzymatic tracer.

The developed electrochemical bioplatfrom involved the preparation of two different batches of the corresponding MBs by means of an immuno-sandwich format through the covalent attachment of specific antibodies on the surface of previously activated HOOC-MBs by EDC/Sulfo-NHS chemistry, and the modification of Strep-MBs with biotinylated hairpin DNA probes through the streptavidin-biotin affinity binding, for the detection of IL-8 protein and IL-8 mRNA, respectively, followed by their incubation with raw saliva samples containing both types of biomarkers that are specifically captured and ultimately labeled with biotin-anti-IL-8 antibodies and Strep-HRP conjugates.

The great usefulness and real applicability of the proposed multiplexed platform, reaching LOD and RSD values of 72.4 pg mL⁻¹, 0.21 nM, 8.3 % and 7.7 %, for IL-8 protein and its associated mRNA, respectively, in undiluted human saliva samples, was evidenced through the determination of endogenous salivary IL-8 protein level in seven healthy participants as well as through recovery studies in raw saliva samples spiked with IL-8 protein and IL-8 mRNA. The obtained results were statistically compared to those provided by commercial ELISA kit for IL-8 determination.

The developed strategy showing a great analytical performance and a suitable selectivity for other non-targets proteins and NC sequences, can be considered as a highly

useful and reliable electrochemical tool able to accurately operate in raw complex non-invasive body fluids in a significantly shorter time compared to the most conventional methodologies, making this platform a very promising and attractive analytical device for the simultaneous interrogation of disease related biomarkers from different molecular level.

1.4. SYNTHESIS AND USE OF PRUSSIAN BLUE NANOPARTICLES AND THEIR METAL STRUCTURAL ANALOGUES SUCH AS NANOZYMES WITH INTRINSIC PEROXIDASE ACTIVITY

Some of the most important and intrinsic drawbacks related to natural enzymes as effective catalyst rely on their low stability at extreme pH and temperature conditions as well as their high cost production. Therefore, there is an increasing demand for synthesizing cheap and more stable nanomaterials-based artificial enzymes, known as nanozymes, able to catalyze a wide number of essential processes in an efficient and cost-effective manner.

Having regard to these needs, nanoparticles composed of Prussian Blue (PBNPs) and other structural analogs from Cu (CuFe NPs) and Co (FeCo NPs and FeCoFe NPs) have been easily synthesized, exhaustively characterized and successfully applied as peroxidase mimics in relevant H_2O_2 -dependent process including dopamine, luminol and NADH oxidation.

The obtained results demonstrated that oxidation of dopamine by H_2O_2 in the presence of PBNPs was 6-fold faster compared to CuFe analogs while FeCo NPs did not catalyze this process. On the contrary, these latter NPs showed excellent catalytic properties in generation of chemiluminescence by means of luminol oxidation and were applied for the development of a glucose sensor based on the *in situ* H_2O_2 generation through aerobic oxidation of glucose in the presence of GOx.

On the other hand, all synthesized nanomaterials showed catalytic activity for H_2O_2 -driven NADH oxidation to NAD^+ being the most effective nanoparticles (PBNPs) coupled to EtOH/AlcDH system proving the effective regeneration of NADH and thus demonstrating that obtained oxidation product was NAD^+ and no other biologically inactive sub-product.

The overall results displayed the potential applications of the proposed cyanometalate nanoparticles as effective catalysts in high relevant analytical, biological and cellular oxidative

events paving the way towards their future application in nanomedicine and other significant scientific branches.

1.5. MILESTONES

The principal milestones of the research work carried in this PhD Thesis include:

- The design and development of biosensors based on competitive and sandwich-based formats for the determination of protein circulating cancer biomarkers in plasma, serum and cell (both entire and lysed).
- The pioneer combination of HaloTag-MBs and p53 fusion protein directly expressed *in vitro* and *in situ* on the surface of the magnetic microcarriers for the development of the first amperometric biosensor for monitoring p53-circulating autoantibodies in serum samples collected from cancer subjects.
- The design and development of novel and simple biosensing strategies based on specific bioreceptors with high affinity against RNA duplexes, both as capture and detector receptors, for the determination of cancer-related miRNAs in RNA_t extracted from cell lines, breast cytologies, and fresh and paraffin-embedded breast human tissues.
- The design and development of a rapid and simple sandwich-based strategy based on a linear and isothermal amplification strategy that has been coupled for the first time to magnetic microcarriers for the determination of miRNAs in RNA_t from breast cancer cell lines and fresh human tissues.
- The design and development of a multiplexed bioplatfrom for the simultaneous interrogation of two cancer related biomarkers of different molecular level (IL-8 protein and its associated messenger RNA IL-8-mRNA) in raw human saliva samples.

- The translation of the methodologies based on specific affinity bioreceptors against RNA–RNA and DNA–RNA duplexes as capture receptors for the development of two multiplexed biosensing platforms for simultaneous interrogation of two different miRNAs in breast cancer cells and fresh human tissues.
- The synthesis and characterization of Prussian Blue nanoparticles and their Cu- and Co- cyanometalates structural analogs as mimicking peroxidase catalyst in highly relevant oxidative processes.

As described in detail in the Dissemination and Transfer of Results section at the end of this Doctoral Thesis, the research carried out during this thesis has allowed the publication of 14 peer-reviewed papers in medium-high impact international journals, the granting of 2 PCT Patents, the presentation of 32 communications (9 invited, 15 oral and 8 poster) to 26 Conferences (5 international, 12 european and 9 national) and the signing of two Art. 83 with companies interested in the developed technology.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El diagnóstico temprano de enfermedades caracterizadas por presentar una elevada tasa de mortalidad, y que afectan a individuos de cualquier raza, sexo, edad y estatus social, como el cáncer, resulta determinante para la aplicación a tiempo de tratamientos eficientes, que permitan reducir el número de muertes y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Sus propiedades y características intrínsecas hacen de los biosensores electroquímicos herramientas altamente prometedoras en la actualidad para el diagnóstico en atención primaria (POC) con importantes aplicaciones en el campo médico. Las plataformas biosensoras electroanalíticas permiten llevar a cabo de una manera rápida, precisa, sensible y selectiva, la detección y determinación de analitos de diferente naturaleza en muestras clínicas de diversa procedencia. Además, la modificación, funcionalización y/o acoplamiento de estos dispositivos con una amplia variedad de reactivos (nanomateriales, polímeros, etc.) y biomoléculas, les dota de una versatilidad única que permite su aplicación para el análisis, tanto individual como múltiple, de biomarcadores clínicos relevantes de diferente nivel molecular.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral, cuya parte experimental ha sido desarrollada en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, es el diseño y desarrollo de novedosas plataformas biosensoras electroquímicas, con aplicabilidad real demostrada, para el biosensado de marcadores clínicos circulantes asociados a la aparición y desarrollo de enfermedades neoplásicas.

Para conseguir estos objetivos, se han diseñado diversas estrategias basadas en el empleo de bio-receptores de afinidad alternativos (sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés “deoxyribonucleic acid”), lineales y de tipo horquilla (“hairpin”) y de ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés “ribonucleic acid”), anticuerpos convencionales y recombinantes (nanobodies), proteínas de fusión producidas por la tecnología HaloTag y proteínas virales), partículas magnéticas micrométricas (MBs) funcionalizadas con una amplia variedad de grupos funcionales y biomoléculas, atendiendo a las necesidades de cada tipo de ensayo, y electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) como

transductores electroquímicos para la detección individual o dual de biomarcadores de cáncer.

La consecución de los objetivos mencionados se ha realizado en el marco de diferentes proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad:

- “Plataformas sensoras basadas en nuevos bio-receptores de afinidad para diagnóstico y pronóstico de cáncer y de enfermedades cardiovasculares. Hacia plataformas de diagnóstico” (Ref: CTQ2012-34238).
- “Nuevas plataformas de multiplexado electroanalíticas para la detección y pronóstico de enfermedades neoplásicas mediante biopsias líquidas” (Ref: CTQ2015-64402-C2-1-R).

El trabajo de investigación realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha seguido un planteamiento que puede dividirse en las siguientes etapas:

1) Desarrollo de estrategias biosensoras para la detección y determinación individual y sencilla de biomarcadores proteicos y genéticos relevantes, asociados al desarrollo y progreso del cáncer. En esta parte de esta Tesis Doctoral se recogen los resultados obtenidos en cuanto al diseño, optimización y evaluación de los distintos biosensores preparados para el análisis individual de cada uno de los analitos de interés, en las muestras seleccionadas.

Así, se han desarrollado biosensores de afinidad que permiten la detección y cuantificación precisa de biomarcadores cancerígenos de distinta naturaleza biológica empleando MBs funcionalizadas con bio-receptores adecuados (anticuerpos, proteínas de fusión HaloTag, proteínas virales y sondas de oligonucleótidos específicas) para la captura selectiva y eficiente de los analitos diana presentes en la muestra problema, acopladas a electrodos desechables para la transducción electroquímica. Durante el proceso de preparación y desarrollo de los distintos biosensores, se han optimizado de manera exhaustiva las variables experimentales que influyen en el proceso de biosensorización y detección electroquímica, con el fin de asegurar las mejores características en términos de sensibilidad, selectividad, sencillez y tiempo de ensayo.

En el caso particular de los sensores de DNA, también se han puesto a punto estrategias isotermas de amplificación de ácidos nucleicos, basadas en la reacción de hibridación en cadena (HCR, por sus siglas en inglés “hybridization chain reaction”).

En este apartado se incluyen trabajos de investigación enfocados al desarrollo de:

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de: fibrinógeno (Fbg), endoglina (o CD105), receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y autoanticuerpos específicos para la proteína p53 (p53-AAAs), en muestras clínicas de diversa categoría y elevada complejidad.
- Genosensores amperométricos para la determinación de micro-RNAs (miRNAs) en muestras de RNA total (RNA_t) extraído de diversas líneas celulares y de tejidos frescos y parafinados de pacientes diagnosticados con cáncer.

El plan de trabajo seguido para la consecución de los objetivos comentados consta de los siguientes apartados:

1. Selección de los elementos de bio-reconocimiento más adecuados para la detección sensible y selectiva de cada analito.
2. Diseño de la estrategia de bioensayo más conveniente.
3. Optimización de las variables experimentales involucradas en la preparación y funcionamiento de los biosensores desarrollados.
4. Evaluación de las características analíticas, selectividad y estabilidad de los biosensores desarrollados.
5. Aplicación a la determinación de los analitos diana en muestras reales y comparación con los resultados que proporcionan otras metodologías analíticas bien establecidas.

2) Desarrollo y aplicación de plataformas para la determinación simultánea de biomarcadores del mismo o distinto nivel molecular para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico de los cánceres de mama y oral y con características compatibles para su empleo en entornos descentralizados y/o en determinaciones rutinarias.

Para el cumplimiento de estos objetivos se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

1. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación individual de cada uno de los biomarcadores.
2. Acoplamiento de las estrategias desarrolladas para la determinación individual en plataformas para determinación dual y aseguramiento de ausencia de fenómenos de reactividad cruzada.

3. Evaluación de las características analíticas, selectividad y estabilidad para la determinación simultánea de los dos biomarcadores diana.
4. Aplicación a la determinación simultánea de los dos biomarcadores en muestras de relevancia clínica y comparación con los resultados que proporcionan metodologías convencionales.

2.2. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES CIRCULANTES DE CÁNCER. ANTEDECENTES BIBLIOGRÁFICOS

El cáncer, con más de 200 variantes [Bohunicky, 2011] es una de las enfermedades más potencialmente mortales en todo el mundo, y por la que más de 1500 personas mueren cada día. A pesar del enorme desarrollo tecnológico en diversas disciplinas científicas, la tasa de supervivencia de los pacientes que sufren esta enfermedad es pobre, debido principalmente a un diagnóstico tardío y a un pronóstico poco esperanzador. De este modo, el desarrollo de ensayos sencillos y rápidos, capaces de detectar cualquier indicio de la enfermedad de una manera temprana y fiable, resulta de extraordinaria relevancia para mejorar la supervivencia de estos individuos.

El inicio y desarrollo del cáncer está estrechamente relacionado con numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas que activan etapas cruciales en los procesos de señalización celular, desencadenando todo tipo de transformaciones tumorigénicas malignas [Jayanthi, 2017], [Ramassone, 2018] mediante la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes, entre otros procesos celulares [Tothill, 2009].

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) define biomarcador como “cualquier indicador de diagnóstico medible empleado para evaluar el riesgo o la presencia de una enfermedad” o, más específicamente “cualquier característica indicativa de un proceso biológico normal, patógeno o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica, que pueda ser medido y evaluado de una manera objetiva” [Ilyin, 2004]. Particularizando en el caso del cáncer, estos biomarcadores incluyen proteínas (enzimas, autoanticuerpos, receptores extracelulares, etc.), genes, productos génicos, células, hormonas y otros tipos de moléculas, producidas tanto por células tumorales como

por otro tipo de células, en respuesta a procesos tumorigénicos. Estas combinaciones específicas de biomarcadores conforman “firmas moleculares” únicas y características de cada célula, capaces de definir el tipo y la etapa de la enfermedad desde un punto de vista molecular en base a sus niveles de expresión [Kamel, 2016]. Estos biomarcadores han demostrado ser detectables tanto en muestras mínimamente invasivas como biopsias líquidas (sangre entera, suero, plasma), secreciones (saliva, esputos, heces, orina) y otros fluidos corporales [Kulasingam, 2008], como en muestras sólidas tisulares accesibles mediante la práctica de biopsias sólidas o prácticas quirúrgicas [Paoletti, 2014].

Aunque actualmente la FDA ha aprobado alrededor de 19 biomarcadores proteicos de cáncer, de los cuáles 11 son detectables en sangre y empleados de manera rutinaria en clínica, la gran mayoría carece de las características esenciales para ser considerados biomarcadores ideales, entre las que se incluyen:

- 1) Ser producido únicamente por células tumorales
- 2) Presentar correlación con la carga tumoral y manifestarse en etapas en las que el cáncer es todavía asintomático
- 3) Encontrarse en una concentración significativamente elevada en pacientes oncológicos en etapas tempranas o preclínicas de la enfermedad
- 4) Ser prácticamente indetectable (o encontrarse a niveles muy bajos) en individuos sanos o con enfermedades benignas
- 5) Poder ser determinado empleando pequeñas cantidades de muestra y tras mínimas etapas de preparación y procesamiento de la misma, mediante ensayos que proporcionen gran sensibilidad (porcentaje de resultados positivos en el análisis del biomarcador en pacientes con cáncer) y especificidad (porcentaje de resultados negativos en el análisis del biomarcador en individuos sanos) [Mordente, 2015].

El método que predomina para el tratamiento de pacientes oncológicos consiste en la administración de un determinado fármaco al que responden favorablemente solo un pequeño porcentaje [Spear, 2001]. Esta práctica se contradice con el principio fundamental de la “medicina personalizada”, basada en la aplicación de tratamientos óptimos para cada tipo de paciente, y que requiere la identificación previa de la parte de la población

diagnosticada con alguna enfermedad que responda positivamente a un tratamiento aplicado y, por tanto, el descubrimiento de nuevos biomarcadores [Khleif, 2010], proceso que consta de las cuatro fases generales que se muestran en la **Figura 1** [Goossens, 2015].



Figura 1: Etapas involucradas en el descubrimiento de biomarcadores de cáncer.

La etapa inicial de **descubrimiento** de un biomarcador comprende tanto su identificación como la de las muestras susceptibles para su determinación y del tipo de población o grupos en los que aplicarse [Mascarell, 2014], [Simon, 2010].

En la fase de **desarrollo** se establecen los procedimientos de análisis para la detección del biomarcador objetivo, para lo que se consideran tres puntos críticos: *selectividad* (capacidad del método para distinguir la señal debida a la molécula objetivo de la de otros componentes), *interferencias* (que determina si hay sustancias cuya presencia afecta a la detección, y si las hay, de qué manera influyen), y *contaminación cruzada* por parte de otras especies o residuos provenientes de otros análisis [Mattocks, 2010]. En esta fase, el biomarcador está sujeto a dos tipos de **validación**: una *validación analítica*, que informa acerca de la precisión y fiabilidad con la que se determina el biomarcador en las muestras de los pacientes, y una *validación clínica*, que determina el grado de robustez y fiabilidad entre los resultados obtenidos en el ensayo que identifica el fenotipo de interés clínico.

La superación de cada una de estas fases por parte del biomarcador conlleva su posible **implementación** en clínica, que a su vez comprende cuatro subetapas claves: aprobación reglamentaria, comercialización, cobertura médica e incorporación en las pautas prácticas [Goossen, 2015].

Dependiendo de su utilidad y de la información que proporcionen, los biomarcadores de cáncer se clasifican en:

- *Biomarcadores de detección temprana*, empleados para el cribado o “screening” de pacientes con la finalidad de detectar de una forma precoz la enfermedad
- *Biomarcadores de diagnóstico*, empleados para la evaluación o determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad
- *Biomarcadores de pronóstico*, que permiten estimar la supervivencia de los pacientes, identificar los fenotipos más agresivos y predecir el comportamiento de la enfermedad neoplásica
- *Biomarcadores de predicción*, capaces de vaticinar la efectividad de distintos fármacos o terapias aplicadas sobre la neoplasia en particular [Laocharoensuk, 2016], [Manne, 2017].

BIOMARCADORES CIRCULANTES

El cáncer, considerado como la consecuencia directa de un conjunto multifactorial de enfermedades, se subdivide en seis procesos principales: *proliferación* de la señalización celular, *crecimiento* descontrolado de las células, *inmortalización* celular, *replicación* de células inmortales, inducción de *angiogénesis* y activación del sistema inmune, invasión y *metástasis* [Hanahan, 2000]. Algunas alteraciones genéticas que tienen lugar en las células, como mutaciones puntuales y procesos de reorganización o amplificación de genes, se manifiestan por la liberación de biomarcadores específicos de acuerdo al tipo de cáncer [Weissleder, 2003], [Sidransky, 2002]. Estos biomarcadores resultan de enorme utilidad clínica para la comprensión de los mecanismos moleculares y la desorganización celular que caracteriza a este tipo de pacientes [Bhatt, 2010]. Estas entidades moleculares, con niveles alterados en las células tumorales, son secretadas al torrente sanguíneo y a diversos fluidos corporales durante las distintas fases de la neoplasia, y pueden detectarse en una gran diversidad de especímenes clínicos y biológicos: células y tejidos, nódulos linfáticos, médula ósea y células liberadas a la circulación, y fluidos corporales como suero, orina, fluidos ascítico, pleural y broncoalveolar, líquidos amniótico y cefalorraquídeo [Wulfkuhle, 2003], saliva, leche materna, etc.

El conjunto de biomarcadores capaces de proporcionar información biológica fiable acerca del desarrollo de procesos normales, patológicos y de respuesta a terapias aplicadas, detectables en fluidos biológicos y corporales, se conocen comúnmente como *biomarcadores circulantes* [Rama, 2016].

Los tumores primarios y las lesiones metastásicas presentan unos niveles de expresión de DNA y RNA particulares, a partir de los cuales es posible elaborar el perfil molecular característico de los distintos tipos de cáncer y, por tanto, aplicar las terapias de tratamiento más apropiadas en cada caso. Sin embargo, estos perfiles moleculares específicos no son estáticos, sino que evolucionan continuamente en respuesta a factores tanto endógenos como exógenos [Siravegna, 2017]. Este fenómeno justifica la enorme heterogeneidad que caracteriza las enfermedades neoplásicas, que dificulta el seguimiento y predicción de la respuesta a las terapias aplicadas en base a una única biopsia, cuyo análisis subestima la complejidad de todo el paraje genómico tumoral. Aunque resulta evidente que la práctica de múltiples biopsias mejoraría el seguimiento y el pronóstico de la enfermedad, el sufrimiento del paciente, los posibles peligros clínicos inherentes, las complicaciones quirúrgicas, los aspectos económicos y la compleja accesibilidad de algunos tumores, hacen que esta práctica no se realice de manera rutinaria [Crowley, 2013]. Una alternativa prometedora que hace frente a todos estos inconvenientes asociados a la biopsia tisular, con aplicaciones potenciales para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, y para el control y seguimiento de pacientes oncológicos, es el análisis de los perfiles moleculares específicos a cada neoplasia empleando biopsias líquidas (**Figura 2**). Esta práctica se basa en la toma de muestras mínimamente invasivas y disponibles en grandes cantidades de diferentes fluidos biológicos para la detección de todo tipo de alteraciones moleculares relacionadas con el proceso tumoral.

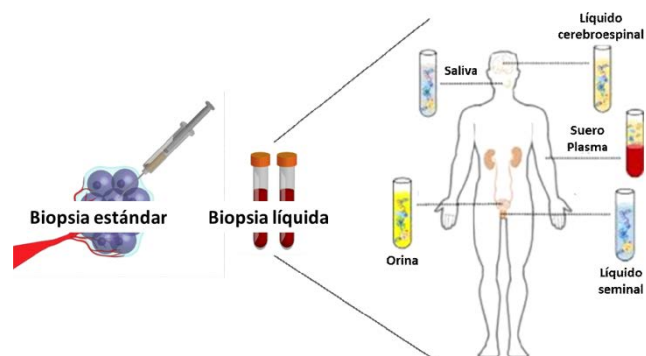


Figura 2: Algunos ejemplos de biopsias líquidas.

A diferencia de las biopsias tisulares, la toma de muestras de biopsias líquidas es un procedimiento sencillo, rápido y que puede aplicarse de manera secuencial en intervalos de tiempos cortos, permitiendo una monitorización en tiempo real de la “carga” total del tumor, así como la predicción y detección de futuras mutaciones genéticas que pueden aparecer durante el tratamiento clínico aplicado [Buder, 2016].

En consecuencia, la detección mediante biopsias líquidas de células cancerígenas, productos genéticos (DNA, RNA), proteínas y otras biomoléculas generadas por el entorno tumoral y liberadas al torrente sanguíneo y otros fluidos corporales, es uno de los avances más prometedores en el campo de la oncología, que proporciona una visión más realista y global de la enfermedad en tiempo real, informando acerca del progreso y/o respuesta a un tratamiento específico aplicado con antelación a la manifestación de síntomas clínicos, que supone un aspecto fundamental para el abordaje terapéutico exitoso de cada paciente en particular. Además, cabe resaltar que este tipo de biopsias permiten diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas, planificando los tratamientos que mejor se adapten a cada tipo de cáncer y paciente, con posibilidad de modificarlos en función de la evolución del tumor, algo totalmente viable y rápido a partir del “rebiopsiado” frecuente y mínimamente invasivo.

Algunos ejemplos de biomarcadores circulantes incluyen: células tumorales circulantes (CTCs), exosomas, ácidos nucleicos circulantes extracelulares (DNA y RNA) [Rapisuwon, 2016], [Zhang, 2017], autoanticuerpos [Belousov, 2010], [Liu, 2017] y una gran variedad de proteínas [Henderson, 2016].

Solo un 0.0000001 % de las CTCs que se liberan al torrente sanguíneo pasan a la circulación. Estas células, tanto más deformadas cuanto mayor es el potencial metastásico del tumor del que derivan, presentan importantes aplicaciones clínicas para el tratamiento y seguimiento de la enfermedad, predicción de riesgos de recaída y empleo como posibles dianas para la inducción de apoptosis en células cancerígenas [Thiele, 2017].

Los exosomas son partículas pequeñas (30–140 nm) liberadas al entorno extracelular contenidas en cuerpos multivesiculares (MVB) que se forman mediante procesos de endocitosis de la membrana plasmática celular. Desempeñan un papel esencial en procesos de señalización celular tanto en estados fisiológicos normales como patológicos, y contienen una gran cantidad de información tanto en su interior como en su superficie, ya que están

enriquecidos en especies de RNA, proteínas, lípidos bifuncionales y, ocasionalmente, DNA [Munson, 2015].

El DNA circulante extracelular (cfDNA) está formado por fragmentos de DNA liberados por todo tipo de células presentes en suero, plasma, orina y otros fluidos biológicos, que informan acerca de la heterogeneidad intratumoral y la evolución de la enfermedad [Salvi, 2016]. Por otro lado, el DNA circulante tumoral (ctDNA) se origina a partir de células tumorales como consecuencia de procesos de apoptosis. Según se ha demostrado en diversos trabajos, la concentración de cfDNA y ctDNA resulta significativamente superior en pacientes oncológicos en comparación con los niveles encontrados en individuos sanos. Estos resultados demuestran el potencial diagnóstico, pronóstico [Han, 2017^a] y de predicción y control del tratamiento [Cappelletti, 2015] que presentan ambos biomarcadores.

El RNA circulante se encuentra en todo tipo de tejidos, células y fluidos, en forma de moléculas de RNA mensajero (mRNA) y de toda una variedad de RNAs no codificantes, como RNAs pequeños nucleares (snRNA) y nucleolares (snoRNA), RNAs largos no codificantes (lncRNAs), RNAs de interacción piwi (pi-RNAs) y micro-RNAs (miRNAs).

Aunque estas especies se diferencian en cuanto a sus funciones biológicas básicas, tamaño y mecanismos por los cuáles se producen, todas ellas muestran alteraciones en sus niveles de expresión durante la aparición y desarrollo de varias enfermedades. También se consideran biomarcadores de gran potencial para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, detección temprana, identificación del origen tumoral y eficacia del tratamiento administrado, presentando diferencias en sus perfiles de expresión en muestras tumorales y normales, y correlaciones establecidas con la tipología de la neoplasia y la quimioresistencia del tumor [Ardila-Molano, 2015]. La información relevante que se extrae de estos ácidos nucleicos circulantes complementa la que ofrecen los biomarcadores proteicos convencionales, proporcionando una caracterización mucho más completa de la enfermedad.

Adicionalmente, las etapas tempranas del proceso de carcinogénesis se caracterizan por la presencia de diversos antígenos asociados al proceso tumoral (TAAs) que desencadenan respuestas inmunológicas como mecanismo de respuesta a mutaciones, sobreexpresión (o hiperexpresión) de proteínas, liberación de entidades proteicas de tejidos dañados [Järås, 2011], procesos inflamatorios, cambios en niveles de expresión y estructura de proteínas, y muerte celular, que llevan asociadas la producción de autoanticuerpos (AAs).

Estas entidades se encuentran de forma estable en el suero y presentan tiempos de vida largos, por lo que pueden ser detectadas fácilmente empleando técnicas mínimamente invasivas. Una de las características más atractivas de estas moléculas circulantes es que, debido a la amplificación por el sistema inmune, se encuentran en niveles superiores a los normales en las etapas más tempranas de la enfermedad, y prácticamente inalterados, aunque el antígeno específico contra el que son producidos se encuentre en niveles bajos e incluso sea indetectable, por lo que su detección puede preceder al diagnóstico clínico de la enfermedad con meses e incluso años de antelación [Zaenker, 2016]. Una de las primeras publicaciones que apoya esta afirmación es el trabajo desarrollado por Royahem y col., en el que se detectan AAs específicos a la proteína p53 con una antelación de entre 17–47 meses previos a la manifestación clínica del tumor, en individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer de pulmón [Royahem, 1998], lo que confirma que los AAs asociados a TAAs son detectables en etapas muy tempranas asintomáticas de la enfermedad [Zaenker, 2013], y por tanto resultan de enorme utilidad como biomarcadores precoces para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, persistiendo en circulación hasta 30 días después de su producción. Es importante resaltar que hasta la fecha se han identificado cientos de AAs asociados a tumores y que, aunque ni todos los antígenos tumorales provocan una respuesta inmune en todos los individuos, ni todas las respuestas inmunes han de ser específicas a tumores, estos biomarcadores tumorales séricos se presentan como alternativas esperanzadoras para la detección precoz de esta enfermedad [Macdonald, 2017].

Entre los analitos más comunes, detectables en todo tipo de especímenes biológicos y empleados frecuentemente para la detección de cáncer y otras enfermedades, destacan las proteínas, que normalmente se encuentran hiperexpresadas en células derivadas de tumores [Tainsky, 2009], estando muchas de ellas aprobadas por la FDA como biomarcadores clínicos [Ludwig, 2005].

Tanto los tejidos sanos como los tumorales secretan proteínas al torrente sanguíneo, pero afortunadamente algunas de ellas son liberadas de manera selectiva solo en condiciones patológicas [Kuppusamy, 2017], informando que algún tipo de cambio, normalmente maligno, está ocurriendo en el organismo.

Entre las proteínas empleadas comúnmente en el análisis oncológico se encuentran los antígenos carcinoembrionarios (CEA), el CA125 y el específico de próstata (PSA), [Hanash,

2011], que junto con CA15-3 y CA19-9 son recomendables para la evaluación de respuestas a terapias paliativas en cáncer metastásico de colon, ovario, mama y páncreas **[Henry, 2012]**.

Aunque el CEA no es un indicador apropiado para los estados metastásicos del cáncer de mama debido a la obtención de falsos positivos en un 10–27 % de la población normal, sus aplicaciones clínicas más fructíferas están enfocadas en la detección temprana de pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal y metástasis en hígado **[Gam, 2012]**.

La glicoproteína CA19-9 no se considera un marcador predictivo eficaz para cáncer de páncreas debido a sus bajos valores de predicción (0.5–0.9 %), sin embargo, Kim y col. **[Kim, 2009]** determinaron correlaciones positivas entre los niveles de esta proteína en muestras de suero de individuos diagnosticados con cáncer de páncreas y los distintos estadios de la enfermedad. A pesar de que CA19-9 es una de las proteínas más utilizadas para el diagnóstico de este tipo de neoplasia, cuyos niveles séricos proporcionan información relevante acerca del pronóstico de la enfermedad y predicción de la supervivencia global, la obtención de falsos positivos y negativos limitan su aplicabilidad universal como biomarcador de cribado en cáncer **[Ballehaninna, 2012]**.

En cáncer de ovario, el antígeno 125 o CA125, uno de los biomarcadores estándar aceptados por la FDA, se encuentra hiperexpresado en, aproximadamente, el 80 % de las pacientes. Aunque los ensayos basados en este antígeno para el diagnóstico de cáncer de ovario presentan una sensibilidad superior al 95 % para tumores positivos, la especificidad de este biomarcador es considerablemente baja ya que puede expresarse en otras variantes de cáncer y procesos inflamatorios. No obstante, el diagnóstico de este tipo de neoplasia se basa en la detección de este biomarcador **[Serio, 2012]**, **[Rastogi, 2016]**.

Otro ejemplo de biomarcador proteico ampliamente utilizado en el diagnóstico de cáncer es el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) **[Triulzi, 2016]**, hiperexpresado en el 15–30 % de los casos de cáncer de mama invasivo, y considerado como uno de los biomarcadores predictivos y de pronóstico de mayor utilidad. Sabiendo que el número aproximado de copias del gen *HER-2* en cáncer de mama es 25–50, esta amplificación equivale a un aumento en la expresión de HER-2 de entre 40–100 veces frente los niveles normales de la misma, lo que resulta en un total de 2 millones de receptores expresados en la superficie de las células tumorales **[Iqbal, 2014]**. El factor pronóstico de HER-2 fue establecido por Slamon y col., mediante el análisis de 189 tumores de mama **[Slamon, 1987]**,

y por Press y col., que demostraron que las pacientes con este tipo de neoplasia que hiperexpresaban HER-2 presentaban un riesgo de recurrencia 9.5 veces mayor que aquellas con una expresión normal del receptor [Press, 1993]. Además, también se ha demostrado que los tumores de mama con amplificación en el gen *HER-2* presentan mayor sensibilidad a ciertos agentes quimioterapéuticos, resistencia a ciertos agentes hormonales y una elevada predisposición a la metástasis cerebral [Gabos, 2006].

IMPORTANCIA EN LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES CIRCULANTES DE CÁNCER Y DEL DESARROLLO DE METODOLOGÍAS TIPO POC

Aunque, generalmente, la detección precoz de las neoplasias está asociada con pronósticos más favorables, según muestran los últimos resultados de “screening” o cribado, la incidencia de cáncer ha aumentado de manera sustancial a pesar de los tratamientos aplicados, lo que puede atribuirse a la falta de fiabilidad de algunos diagnósticos y pronósticos.

La detección precoz del cáncer mediante la identificación de “firmas moleculares” características establecidas para cada tipo de neoplasia, permitirá la aplicación de tratamientos más efectivos y la mejora en la calidad de vida y supervivencia global de los pacientes. Por ello, resulta de imperiosa necesidad detectar, estratificar y predecir los riesgos de esta enfermedad, con el objetivo de implementar tratamientos terapéuticos apropiados para el seguimiento continuo de la enfermedad y de las respuestas frente a los tratamientos aplicados, ofreciendo una “medicina personalizada” a cada paciente en particular y permitiendo a los especialistas vaticinar qué tratamientos resultarán más beneficiosos o cuándo ha llegado el momento de detenerlo, en base a la respuesta obtenida frente a diversos fármacos administrados [Ghosh, 2017].

En base a lo anterior, durante los últimos años se ha incrementado la búsqueda de metodologías sencillas, con aplicabilidad en diferentes entornos, de rápida respuesta y con características adecuadas en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad y robustez, capaces de detectar con elevada precisión cualquier biomarcador o paneles de biomarcadores que conformen los perfiles o retratos moleculares específicos de cada neoplasia, con el fin de poder emitir diagnósticos más precisos y administrar los tratamientos específicos requeridos en cada caso particular y en el momento oportuno.

En este sentido, los sensores químicos, y en especial los biosensores, se consideran herramientas analíticas prometedoras adaptables a las necesidades particulares para el análisis de todo tipo de muestras fisiológicas de diversa procedencia. Las excelentes propiedades inherentes a su fabricación pueden ser aprovechadas para la elaboración de diagnósticos en tiempo real de una manera ultrasensible y fiable, como dispositivos POC, proporcionando resultados clínicos en pocos minutos incluso en entornos distintos a los del servicio sanitario común [Campuzano, 2017^a]. Las enormes posibilidades que ofrecen estos dispositivos de manejo sencillo y coste asequible hacen que su implementación en el sector clínico como sistemas avanzados e inteligentes para la detección, determinación, evaluación y seguimiento de biomarcadores de diversa naturaleza biológica, para el pronóstico de cáncer y de otras enfermedades de alto impacto [Ranjan, 2017], sea una realidad cada vez menos inalcanzable. La **Figura 3** muestra algunos ejemplos de biosensores integrados con potenciales aplicaciones para su utilización como herramientas portátiles e inalámbricas de alta eficacia para la monitorización de diversos estados de la salud humana.

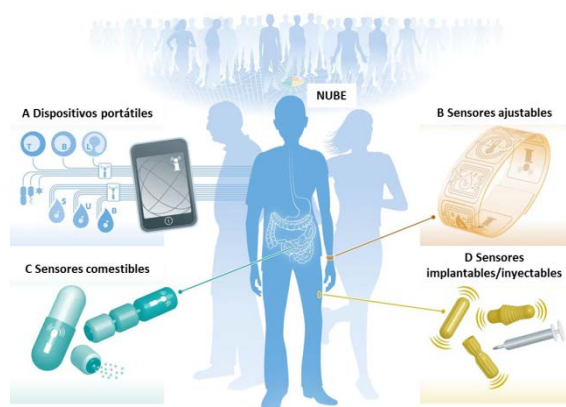


Figura 3: Biosensores integrados para la monitorización personalizada de los estados de salud.

SENSORES Y BIOSENSORES: CLASIFICACIÓN

Desde el punto de vista científico, un **sensor** se define como “un dispositivo que responde a una entrada física de interés y proporciona una salida registrable y funcionalmente relacionada con la entrada, que suele ser óptica o eléctrica” [Jones, 2010], aunque de manera más simple y específica se definen como “dispositivos capaces de medir alguna variable de interés a través de una gran variedad de mecanismos, y cuyo rendimiento o señal de salida es convertida y procesada en una señal medible mediante el empleo de un transductor” [McGrath, 2013].

De entre la gran variedad existente, los sensores químicos son los más utilizados para el análisis de todo tipo de especies. Estos dispositivos, cuyos componentes esenciales los forman una parte receptora y una parte transductora, transforman la información originada a partir de una reacción química en la que la especie a determinar está involucrada, o a partir de una propiedad física del sistema en el que participa, en una señal analítica medible, mediante la conversión de la información química en una forma de energía, por el receptor, y la transformación de dicha energía en un tipo de señal, por el transductor.

De acuerdo con el principio de actuación, la parte receptora del sensor puede ser:

- Física, donde no tiene lugar reacción química alguna
- Química, donde la señal analítica se origina a partir de una reacción química, en la que participa el analito objeto de análisis
- Bioquímica, donde el origen de la señal analítica es un proceso bioquímico

Algunos ejemplos de este último tipo son los sensores microbianos, los sensores de ácidos nucleicos o los inmunosensores, clasificados como un subgrupo de sensores químicos conocidos como biosensores [Hulanicki, 1991].

Un **biosensor**, entendido como la combinación de dos partes, bio-elemento y elemento sensor, es un dispositivo analítico que incorpora una entidad de sensado biológico acoplada a un transductor, que permite el desarrollo cuantitativo de algún parámetro bioquímico complejo [Mohanty, 2001]. La combinación entre la especificidad y sensibilidad de la biología y de los transductores físico-químicos, respectivamente, hace que los biosensores permitan llevar a cabo medidas bioanalíticas complejas a partir de formatos simples y de sencillo manejo [Turner, 2013].

Dependiendo de la modalidad de detección, los biosensores se clasifican en:

- 1) Biosensores basados en detección directa, en los que la interacción biológica entre la parte receptora y el analito que se quiere determinar se mide de forma directa en tiempo real, y la formación del complejo biomolécula-analito proporciona cambios en las propiedades físicas o eléctricas de la superficie transductora. Este tipo de sensores son normalmente los menos sensibles, particularmente en el caso de la detección de moléculas pequeñas como toxinas.

2) Biosensores basados en detección indirecta, que consisten en procesos de reconocimiento del analito por moléculas convenientemente marcadas que permiten la monitorización del proceso de reconocimiento molecular. Los marcajes más utilizados en este tipo de sensores son moléculas fluorescentes, enzimas (como fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano (HRP)), microorganismos e incluso tejidos de plantas o mamíferos [Rasooly, 2006].

Los sensores basados en detección indirecta, de acuerdo con el tipo de estrategia o formato de ensayo empleado para su desarrollo, se pueden subclasificar a su vez en biosensores basados en:

- *Ensayo no competitivo* (o ensayo tipo “sándwich”), donde el analito presente en la muestra es capturado por un exceso de anticuerpo de captura que lo separa de la muestra para ser expuesto a un exceso de anticuerpo secundario, normalmente conjugado a una enzima o especie reactiva, quedando el antígeno “ensandwichado” entre los dos anticuerpos. En este tipo de ensayos, la señal obtenida resulta directamente proporcional a la cantidad de analito capturado por el anticuerpo primario y, aunque idealmente no se debería obtener señal alguna en ausencia de la molécula diana, en la práctica esto no ocurre debido a interacciones inespecíficas entre el anticuerpo marcado y otros componentes del ensayo, por lo que es conveniente emplear agentes bloqueantes que minimicen este tipo de interacciones no deseadas. Aunque este tipo de formatos ofrecen una elevada especificidad en el proceso de detección, en general solo pueden emplearse para la cuantificación de analitos que presenten dos regiones antigénicas capaces de ser reconocidas simultáneamente por cada uno de los dos anticuerpos [Fowler, 2008].

- *Ensayo competitivo*, donde la muestra que contiene el antígeno de interés, junto con una cantidad conocida de antígeno marcado, se añade sobre una cantidad conocida de anticuerpo específico al mismo. El antígeno libre presente en la muestra compite con el antígeno marcado por los sitios de unión del anticuerpo, lo que genera una disminución de la señal analítica a medida que aumenta la concentración del antígeno libre en la muestra analizada. Estos ensayos se emplean usualmente para la detección de moléculas pequeñas, como drogas, y uno de sus principales problemas reside en los procedimientos de marcaje del antígeno de forma que afecte lo menos posible a la eficiencia de la interacción antígeno-anticuerpo [Buxbaum, 2015].

Los ensayos de tipo competitivo, a su vez, pueden clasificarse en dos subgrupos en función de cómo tiene lugar la competición por los sitios libres del anticuerpo. Los ensayos competitivos **directos** comprenden aquellos en los que el antígeno libre y el antígeno marcado, ambos en disolución, compiten por los sitios de unión del anticuerpo específico previamente inmovilizado sobre alguna superficie sólida (como un transductor electroquímico), mientras que los ensayos competitivos **indirectos** se basan en la competición entre el antígeno libre en disolución y el mismo antígeno, o algún derivado del mismo, inmovilizado sobre alguna superficie sólida, por los sitios libres del anticuerpo específico, convenientemente marcado con alguna molécula señalizadora, y presente en disolución.

Entre las entidades biológicas que pueden ser empleadas para la fabricación de biosensores destacan enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas, hormonas, estructuras celulares y tejidos, capaces de interactuar de manera específica con el analito diana y desencadenar la reacción bioquímica correspondiente que será convertida en una señal analítica medible [Monošík, 2012].

Atendiendo al tipo de entidades biológicas o tipo de elementos de reconocimiento, los biosensores se clasifican como:

- Biosensores de tipo catalítico, que incluyen el empleo de enzimas, microbios, orgánulos, células o tejidos.

- Biosensores de afinidad, que incluyen el empleo de anticuerpos, ácidos nucleicos y otros receptores de afinidad, principalmente.

Los biosensores catalíticos basados en enzimas como glucosa oxidasa (GOx), HRP [Perumal, 2014] y AP, son los más utilizados debido a la disponibilidad comercial, a la elevada actividad catalítica y al coste asequible de estas enzimas. Estas biomoléculas pueden modificarse genéticamente en función de las necesidades requeridas de ensayo, por lo que se pueden adaptar de manera sencilla a la determinación de numerosos analitos. Además, el hecho de que su actividad catalítica permanezca inalterada hasta que se alcanza el final de la reacción en la que están involucradas, es una de las ventajas más atractivas que ofrecen para la fabricación de biosensores. Sin embargo, la limitada estabilidad de las enzimas y la elevada dependencia de su actividad catalítica frente a factores como el pH, fuerza iónica, inhibición química y temperatura, son algunas de las limitaciones de este tipo de biosensores, que

pueden superarse mediante el empleo de nanomateriales como nanotubos de carbono (CNTs) y nanopartículas de oro (AuNPs), y otros elementos como bio- y prepolímeros, hidrogeles sol/gel y apoenzimas, que mejoran la bioestabilidad de la enzima inmovilizada durante un mayor periodo de tiempo y proporcionan una base conductora excelente para una inmovilización más efectiva y ordenada en la superficie del electrodo [Patel, 2016].

En los biosensores de afinidad, el enlace entre el analito diana y las biomoléculas inmovilizadas en la superficie del elemento transductor está gobernado por interacciones de afinidad bajo consideraciones termodinámicas, como los enlaces antígeno-anticuerpo (Ag–Ab), hibridación de oligonucleótidos, o enlaces de tipo proteína-ácidos nucleicos [Palchetti, 2014]. El desarrollo de este tipo de biosensores, especialmente aquellos que se basan en el empleo de transductores electroquímicos, cuenta con numerosas e importantes aplicaciones para la determinación de todo tipo de analitos, desde toxinas, pesticidas, microorganismos, moléculas alergénicas [Campuzano, 2017^b] y biomarcadores circulantes de diverso nivel molecular asociados al desarrollo de enfermedades de gran relevancia como el cáncer [Campuzano, 2017^c].

Debido a su elevada afinidad, versatilidad y disponibilidad comercial, los biosensores de afinidad basados en el empleo de anticuerpos como elementos de reconocimiento, conocidos comúnmente como inmunosensores, son unos de los tipos de biosensores más empleados en todo tipo de campos científicos.

Los anticuerpos son glicoproteínas sintetizadas por células B en billones de formas, cada una con una secuencia de aminoácidos distinta y diferentes sitios de unión al antígeno. Comúnmente conocidos como inmunoglobulinas (Igs), estas biomoléculas, caracterizadas por su elevada solubilidad y por ser uno de los componentes proteicos más abundantes en suero [Alberts, 2002], pueden dividirse en cinco grandes grupos dependiendo de la secuencia de la región constante de su cadena pesada: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA.

Las IgMs son inmunoglobulinas pentaméricas asociadas con la primera respuesta de defensa que presentan una función determinante en los procesos de autoinmunoregulación.

Las IgDs son inmunoglobulinas circulantes que presentan bajos niveles en suero y vida media corta, mientras que las IgGs son las glicoproteínas más predominantes en el organismo, con la mayor vida media en comparación con otros isotipos.

En el caso de las IgAs, sus niveles en suero suelen ser mayores que los de IgMs, pero menores que los de IgGs, aunque se encuentran en mayor concentración que las IgGs en la superficie de las mucosas y otras secreciones como saliva y leche materna [Schroeder, 2010].

La estructura de las IgGs, esquematizada de manera general en la **Figura 4**, está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, que constan de dos cadenas pesadas (compuestas a su vez por una región variable o V_H y tres regiones constantes o C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) y dos cadenas ligeras (compuestas por una región variable o V_L y una región constante o C_L) unidas mediante enlaces de tipo disulfuro, subdivididas en dos regiones o fragmentos, denominados fragmento antígeno-anticuerpo (Fab) y fragmento constante (Fc). Mientras que el fragmento Fab contiene la región variable F_v , donde se encuentran localizadas las regiones determinantes de complementariedad o CDRs, que confieren la especificidad frente al antígeno en cuestión, la región Fc es esencial para mediar diversas funciones relacionadas con la citotoxicidad, fagocitosis celular, regulación y activación celular, y proliferación, entre otras [Sharma, 2016]. Además de las IgGs, existen otros tipos de anticuerpos con gran aplicabilidad en biotecnología, como los anticuerpos de los camélidos, obtenidos principalmente de dromedarios, llamas, alpacas y camellos, que muestran un único dominio para la unión efectiva con el antígeno, conocidos como anticuerpos de cadena simple, anticuerpos V_{HH} o nanobodies, y los novedosos receptores de antígenos (IgNAR), descubiertos en los cartílagos de los tiburones y que presentan también un único dominio o región variable (VNAR) [Trilling, 2013].

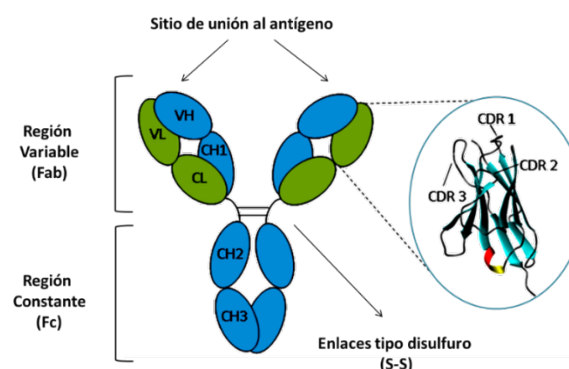


Figura 4: Estructura esquemática de una IgG mostrando sus principales regiones.

Los inmunosensores se definen como dispositivos analíticos capaces de detectar la unión del antígeno de interés a su anticuerpo específico acoplando la reacción

inmunoquímica originada a la superficie del transductor. Idealmente, un biosensor de afinidad basado en estos elementos de reconocimiento debe poseer la capacidad de: 1) detectar y cuantificar el antígeno de interés dentro del rango de concentración requerida y en un tiempo de análisis razonable, 2) traducir la reacción de reconocimiento Ag–Ab sin necesidad de emplear reactivos externos añadidos, 3) repetir la medida empleando el mismo dispositivo, es decir, la reacción inmunoquímica debería ser reversible, y 4) detectar la unión específica del antígeno en muestras reales.

Aunque a día de hoy no se ha desarrollado ningún inmunosensor que cumpla la totalidad de las especificaciones anteriores, estos dispositivos se consideran poderosas herramientas de gran utilidad para la monitorización de interacciones bioespecíficas en tiempo real y cuya respuesta proporciona información acerca de las cinéticas de enlace de las reacciones inmunológicas y de las estructuras de las moléculas y sus funciones biológicas [Gizeli, 1996].

Los biosensores de afinidad basados en ácidos nucleicos se basan en procesos de hibridación entre secuencias de oligonucleótidos en función de la complementariedad de bases. Tras inmovilizar un fragmento de DNA (o RNA) que presenta una secuencia complementaria a la del oligonucleótido diana presente en la muestra que se quiera determinar, tiene lugar un proceso de hibridación eficiente que puede monitorizarse y traducirse en una señal analítica medible a partir del transductor empleado [Minunni, 2003]. En la actualidad existen numerosas variantes sintéticas y naturales de DNA y RNA (DNA cromosómico, ácidos nucleicos virales y plasmídicos) empleados como elementos de reconocimiento en el desarrollo de este tipo de herramientas biosensoras [Labuda, 2010]. Estos ácidos nucleicos se encuentran disponibles funcionalizados con todo tipo de moléculas (tioles, grupos disulfuros, grupos amino, biotina) y espaciadores de hidrocarburos largos y flexibles con el fin de facilitar su inmovilización y mejorar su accesibilidad hacia el oligonucleótido diana sobre superficies transductoras.

Aunque la hibridación entre secuencias de DNA es la más frecuente, las hibridaciones de tipo DNA–RNA y RNA–RNA también pueden ocurrir, siendo tanto más específicas cuanto mayor es el grado de complementariedad entre ambas secuencias, tanto en disolución homogénea como sobre la superficie sólida del transductor. En el caso de una complementariedad total entre la sonda y la secuencia diana, la especificidad y estabilidad de

los enlaces alcanza su valor máximo, aunque dada la dificultad que supone la determinación precisa de la concentración de ácidos nucleicos inmovilizados sobre soportes sólidos, los mecanismos moleculares de hibridación en estos casos son, todavía, bastante impredecibles [Teles, 2008].

Teniendo en cuenta que tanto el bio-receptor como el tipo de transductor empleado son la base del desarrollo de los biosensores, el procedimiento de inmovilización del receptor sobre la superficie transductora es un factor determinante en el rendimiento global y la sensibilidad del dispositivo final. La correcta inmovilización de los bio-receptores debe garantizar la accesibilidad de sus sitios activos a los analitos diana y asegurar una proximidad con el transductor que permita la obtención de respuestas eficientes, de manera que el tipo de inmovilización seleccionado afectará a un gran número de parámetros, incluyendo sensibilidad, estabilidad, repetibilidad, tiempo de respuesta y grado de adsorciones inespecíficas [Prieto-Simón, 2008].

Los métodos de inmovilización de los elementos de reconocimiento biológico para el desarrollo de biosensores se clasifican en dos grandes grupos: **métodos reversibles**, en los que el soporte sólido puede regenerarse empleando condiciones suaves, y **métodos irreversibles**, en los que no es posible retirar las biomoléculas inmovilizadas de la superficie sólida sin que repercuta en la actividad biológica del elemento de reconocimiento o de la superficie del soporte.

Los métodos reversibles engloban la inmovilización de biomoléculas mediante adsorción, enlaces de afinidad, enlaces metálicos o de tipo quelato, y formación de enlaces disulfuro, y entre los irreversibles, se encuentran los procesos de inmovilización mediante formación de enlaces covalentes, reacciones de entrecruzamiento y atrapamiento o micro-encapsulación [Liébana, 2016].

MÉTODOS REVERSIBLES

- *Inmovilización por adsorción*: Consiste en la adsorción física de biomoléculas sobre la superficie del transductor mediante fuerzas de tipo *van der Waals*. Esta inmovilización, sencilla y aplicable a una gran variedad de superficies, no requiere ninguna modificación química del receptor biológico, pero debido a la debilidad del enlace, cambios en el pH, fuerza

iónica o temperatura durante la realización de las medidas experimentales, pueden provocar la desorción de los bio-receptores [Mello, 2002].

- *Inmovilización basada en reacciones de afinidad*: Se caracterizan por su gran selectividad. Algunos ejemplos incluyen las reacciones de afinidad entre lectinas y azúcares, antígenos y anticuerpos, biotina y avidina, y aquellas basadas en el uso de proteínas bacterianas de unión a inmunoglobulinas como la proteína A o G [Liébana, 2016].

- *Interacción biotina-(estrept)avidina*: Esta interacción específica es una de las más sencillas y empleadas para la inmovilización controlada de proteínas y oligonucleótidos [Kim, 2008]. La avidina es una glicoproteína básica ($pI=10$) con cuatro sitios de unión a biotina y una modificación con oligosacárido. Aunque la constante de disociación biotina-avidina (1.3×10^{-15} M) demuestra la elevada afinidad entre ambas entidades, una de las desventajas de este método de inmovilización es su elevada tendencia a unir inespecíficamente otros componentes, debido al elevado pI y al contenido en carbohidratos que contiene. Por otro lado, la estreptavidina (Estrep), proteína de unión a biotina de origen bacteriano (*Streptomyces avidinii*), presenta una estructura primaria distinta a la avidina, lo que resulta en una disminución de su pI (alrededor de 5–6). La combinación entre la fuerza y resistencia de la interacción estreptavidina-biotina, hacen de esta inmovilización una estrategia extraordinariamente útil para la conjugación/inmovilización de cualquier biomolécula [Hermanson, 2008].

- *Inmovilización mediante proteínas A/G*: Esta inmovilización se usa principalmente para inmovilizar anticuerpos sobre soportes sólidos.

Tanto la proteína A (ProtA) (cadena polipeptídica sencilla de 42 kDa presente en la pared celular del *Staphylococcus aureus*) como la proteína G (ProtG) (cadena polipeptídica de aproximadamente 30 kDa, y originaria de *Streptococcus*) presentan gran afinidad para la unión a inmunoglobulinas a través de su región Fc, permitiendo su inmovilización con la orientación apropiada para un enlace óptimo con el antígeno. Además, ya que los elementos de reconocimiento no requieren ningún tipo de modificación extraordinaria para su inmovilización, mantienen la totalidad de su capacidad de unión hacia el antígeno, mejorando las capacidades sensoras de la estrategia en comparación con los métodos tradicionales de inmovilización de biomoléculas con una orientación aleatoria [Danczyk, 2003], [Bilitewski,

2006]. Estas proteínas de unión pueden ser diseñadas y modificadas química y genéticamente con diversos grupos y moléculas como tioles y residuos de cisteína **[Lee, 2007]**, o encontrarse fusionadas a otras biomoléculas como histidina (His) **[Patrie, 2007]**, glutatión-S-transferasa (GST) **[Ha, 2007]**, proteínas dependientes de la temperatura de tipo elastina (ELP) **[Gao, 2006]** y oligonucleótidos **[Jung, 2007]**, lo que permite un mayor control de su inmovilización sobre los soportes correspondientes.

La forma nativa de la ProtG reconoce dominios Fab y Fc de todos los subtipos de IgGs de humano, conejo, ratón, y cabra, aunque su afinidad por la región Fab es 10 veces menor que por la Fc. Sin embargo, la capacidad de unión de la ProtA frente a IgA, IgM e IgE es más limitada y muestra una mayor afinidad de enlace frente a IgGs. Uno de los parámetros a considerar para la correcta selección del tipo de proteína de unión a anticuerpos y su aplicación en sistemas de inmunosensado, es el pH óptimo de unión de la biomolécula, ya que para la ProtG la máxima eficiencia de unión a IgGs es a pH entre 4 y 5, mientras que para la ProtA es a pH 8 **[Makaraviciute, 2013]**.

- *Inmovilización por enlaces disulfuro*: En este caso se producen entre el soporte sólido y la biomolécula a inmovilizar, enlaces covalentes tipo S–S que pueden romperse mediante reacción con agentes como ditioneitol (DTT) bajo condiciones experimentales suaves. Dado que la reactividad de los grupos tioles puede modularse alterando de manera adecuada el pH, el rendimiento y la especificidad de este tipo de inmovilización suele ser alta **[Bulaj, 2005]**.

MÉTODOS IRREVERSIBLES

- La inmovilización de receptores mediante *atrapamiento* se basa en el empleo de matrices poliméricas inertes (poliacrilamida, quitosano, nylon, sol-gel, etc.) cuya estructura tridimensional atrapa grandes cantidades de biomoléculas. Estas metodologías se caracterizan por aumentar la estabilidad química y térmica del bio-receptor, por la sencillez de preparación sin necesidad de llevar a cabo modificaciones covalentes y por la excelente flexibilidad, pudiendo controlar el tamaño de poro, así como la geometría. Algunos de sus inconvenientes son las grandes barreras de difusión y la posible pérdida de conformación de la biomolécula debido a su liberación a través de los poros de la matriz, aunque esto puede evitarse empleando membranas semipermeables **[Prieto-Simón, 2008]**. Además de estas opciones, las biomoléculas también pueden ser atrapadas mediante su incorporación a

polímeros conductores (como polipirrol o polianilina) obtenidos por electropolimerización de monómeros funcionales [Cosnier, 1999], [Arora, 2007].

- La inmovilización por *entrecruzamiento* o “*cross-linking*” es otro método de inmovilización irreversible basado en la formación de enlaces entrecruzados entre los receptores biológicos y reactivos bi- o multifuncionales. El glutaraldehído (GA) es uno de los agentes entrecruzantes más utilizados para la inmovilización de proteínas mediante la reacción de los grupos amino libres de los residuos de lisina y oligómeros o polímeros del GA resultantes de condensaciones aldólicas inter- e intramoleculares [Mohamad, 2015], de forma que las biomoléculas son ancladas a la superficie por diversos puntos, minimizando su desnaturalización y desplegamiento. Algunos inconvenientes de esta estrategia de inmovilización incluyen su poca reproducibilidad, la gran cantidad de biomolécula requerida y la posible toxicidad que presentan algunos agentes entrecruzantes [Prieto-Simón, 2008].

- Inmovilización por *enlace covalente*: Esta variante de inmovilización se basa en el enlace de los elementos de reconocimiento al soporte sólido previamente activado con reactivos multifuncionales tipo carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Esta inmovilización puede realizarse directamente sobre la superficie del transductor, sobre membranas fijadas en la superficie del mismo, o sobre una gran variedad de soportes como materiales inorgánicos, polímeros sintéticos o naturales, o incluso membranas que hayan sido previamente activadas.

La inmovilización covalente mediante química EDC consiste en la activación previa de los grupos carboxilos presentes en el soporte sólido para, consecuentemente, enlazar con los grupos $-NH_2$ de la biomolécula. En el proceso de activación mediante EDC, normalmente se emplea NHS con la finalidad de mejorar la eficiencia de la inmovilización.

El procedimiento convencional más empleado para la activación de grupos carboxilo mediante reacción con EDC y NHS e inmovilización covalente de biomoléculas se muestra en la **Figura 5**, donde se detalla el mecanismo de reacción del proceso.

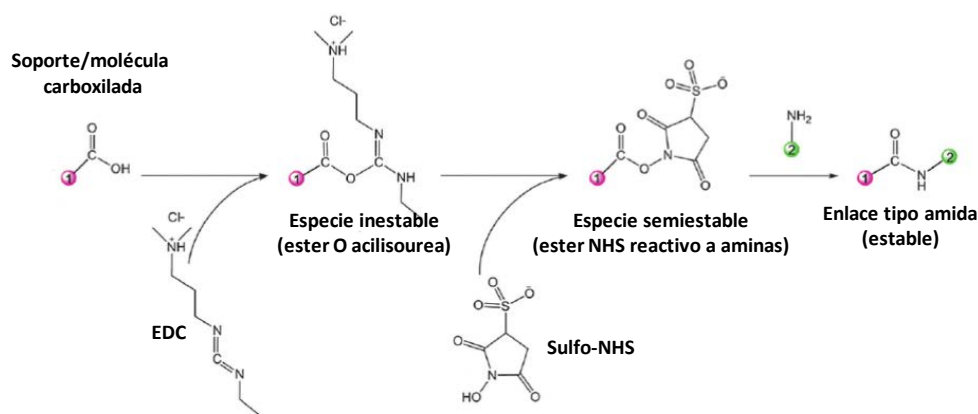


Figura 5: Mecanismo de reacción de acoplamiento covalente mediante química EDC/Sulfo-NHS.

Si el soporte sólido se encuentra funcionalizado con grupos -NH_2 , algunos de los métodos para anclar biomoléculas a la superficie consisten en llevar a cabo el enlace entre los grupos -NH_2 y los grupos -COOH del elemento de reconocimiento a partir de agentes entrecruzantes, o transformando previamente los grupos -NH_2 del soporte en sales de diazonio y acoplando las biomoléculas a la superficie mediante enlaces covalentes de tipo diazo [Sassolas, 2012].

Por otro lado, el empleo de monocapas autoensambladas (SAMs) permite inmovilizar biomoléculas con una orientación definida, mejorando considerablemente la reproducibilidad, estabilidad y precisión del proceso de inmovilización. Técnicamente, la formación de una monocapa consiste en el ensamblaje espontáneo de cadenas alifáticas convenientemente funcionalizadas con grupos -OH , -NH_2 , -SH , tioéster, tionas y disulfuros de alquilo, entre otros, sobre superficies metálicas (normalmente de Au) o de vidrio para formar enlaces covalentes estables entre los grupos terminales de las cadenas y la superficie activada [Debasis, 2011].

Además de las estrategias comentadas para la funcionalización de superficies, el empleo de distintos materiales micro- y nanométricos, como AuNPs, nanopartículas poliméricas, puntos cuánticos semiconductores, CNT, nanodiamantes y grafeno, entre otros, han permitido el desarrollo exitoso de distintos tipos de biosensores. Debido a sus propiedades ópticas y eléctricas, biocompatibilidad, conductividad, actividad catalítica y estabilidad, el empleo de estos (nano)materiales ha permitido mejorar la sensibilidad de la metodología y la obtención de límites de detección más bajos [Holzinger, 2014]. Además, pueden utilizarse como elementos de marcaje y modificadores de superficie, aumentando el

área superficial electroactiva y favoreciendo la transferencia electrónica hacia o desde la superficie del transductor [\[Reverté, 2016\]](#).

Las nanopartículas de metales nobles, de elevada área superficial, alta resistencia mecánica y extraordinarias propiedades catalíticas y electrónicas, se han aplicado activamente para detectar procesos de reconocimiento biológico. Entre ellas, las AuNPs, que demuestran además una excelente biocompatibilidad, son uno de los nanomateriales más utilizados en el desarrollo de biosensores [\[Doria, 2012\]](#) para la detección de todo tipo de analitos de relevancia clínica, entre los que destacan biomarcadores proteicos de cáncer como alpha-fetoproteína (AFP) [\[Giannetto, 2011\]](#), [\[Xiong, 2012\]](#), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [\[Elshafey, 2013\]](#), CEA [\[Sun, 2012\]](#), [\[Springer, 2012\]](#), PSA [\[Uludag, 2015\]](#), [\[Kavosi, 2014\]](#), [\[Presnova, 2017\]](#), interleucina-8 (IL-8) [\[Munge, 2011\]](#) e interleucina-6 (IL-6) [\[Jensen, 2011\]](#), y biomarcadores cardiacos como el péptido natriurético-B (BNP) [\[Serafín, 2018\]](#), entre otros. Estas NPs también se han aplicado a la determinación de biomarcadores genéticos relevantes como ERBB2 y CD24, mediante secuencias de DNA tioladas inmovilizadas sobre AuNPs y secuencias de DNA complementarias a las dianas, marcadas con HRP [\[Saeed, 2017\]](#), miRNA-21 [\[Mandli, 2017\]](#), let-7a [\[Xiong, 2017\]](#), y miRNA-126 y miRNA-125a-5p [\[Wang, 2016^a\]](#). Otros nanomateriales metálicos ampliamente utilizados en el desarrollo de biosensores son las nanopartículas de Azul de Prusia (PBNPs), cuyas propiedades estructurales y actividad intrínseca de tipo peroxidasa han permitido su utilización como soportes para la inmovilización de anticuerpos selectivos a CA125 sobre electrodos vitrificados de carbono [\[Chen, 2008\]](#) y como entidades de detección conjugadas a anticuerpos específicos de PSA [\[Fu, 2016\]](#) y a albúmina de suero humana (HSA) [\[Farka, 2018\]](#), para la fabricación de plataformas inmunosensoras electroquímicas.

Otra de las herramientas de las que se dispone en la actualidad y que ofrece gran versatilidad para el desarrollo de biosensores son las MBs, que pueden emplearse como soportes sólidos para la realización de diferentes bioensayos, facilitando tanto el proceso de preparación del biosensor como las etapas de detección [\[Yáñez-Sedeño, 2016\]](#), [\[Kudr, 2018\]](#).

En comparación con fases sólidas planas, además de su mayor área superficial, las MBs presentan gran estabilidad física y química, baja toxicidad y alta biocompatibilidad, y gracias a su fácil dispersión mediante agitación suave, los procesos de reconocimiento entre las biomoléculas inmovilizadas en la superficie de las mismas y los analitos presentes en

disolución requieren tiempos cortos. Además, las MBs pueden ser utilizadas como fase sólida móvil con vistas a la miniaturización del sistema, requiriendo pequeños volúmenes de reactivos, tiempos de ensayo cortos y proporcionando límites de detección bajos, aspectos profundamente conectados con la relación entre la superficie reactiva de las MBs y el volumen de muestra [Kuramitz, 2009]. Estos materiales, con tamaños comprendidos entre nm- μ m, consisten en un núcleo paramagnético o súperparamagnético de óxido de hierro en forma de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [de Dios, 2010], [Andreescu, 2009], [Teja, 2009], protegido por una capa polimérica externa adecuada para la inmovilización de moléculas de todo tipo y naturaleza [Albers, 2003]. De entre las ventajas que ofrecen las MBs para el desarrollo de bioensayos destacan la mejora en las reacciones de afinidad como consecuencia de una cinética de ensayo más favorable, ya que las etapas de modificación se realizan en disolución, y la significativa minimización de la posible existencia de efecto matriz gracias a la sencillez y eficiencia de las etapas de separación y lavados asociadas con la manipulación de este tipo de materiales paramagnéticos, sobre los que es posible llevar a cabo el análisis del analito de interés directamente en muestras de gran complejidad sin necesidad de etapas tediosas de pre-enriquecimiento, purificación o dilución [Centi, 2007]. Además, dadas sus excelentes propiedades paramagnéticas, las MBs modificadas permiten aislar productos en disolución mediante la aplicación de un campo magnético externo, de forma que, una vez el analito es capturado, el conjunto analito-receptor/MBs puede ser concentrado, aislado de la matriz de la muestra y preconcentrado en otro tipo de superficie mediante la acción de un imán externo [Aguilar-Arteaga, 2010].

En función de las necesidades específicas de los bioensayos, existen disponibles comercialmente una amplia variedad de MBs funcionalizadas con diversos grupos (carboxilo, amino, hidroxilo, sulfatos, etc) y biomoléculas (ProtA, ProtG, Estrep, etc) e incluso pre-activadas con grupos tosilo, epóxidos y de tipo clorometilo.

Las MBs modificadas con grupos carboxilo (HOOC-MBs), son ampliamente utilizadas para la inmovilización covalente de anticuerpos mediante la activación previa de los mismos empleando EDC/NHS, entre otros reactivos. Las MBs pre-activadas con grupos tosilo, epóxido, etc, son adecuadas para la inmovilización de distintos grupos dependiendo del pH, y las MBs conjugadas a diversas proteínas, aunque son las menos atractivas desde el punto de vista

económico, presentan una elevada especificidad para la inmovilización de todo tipo de biomoléculas en su superficie.

La sencilla funcionalización, biocompatibilidad y posibilidad de captura magnética de forma estable y reproducible de las MBs sobre la superficie de distintos sustratos electrónicos convencionales o impresos, hacen de estos materiales una opción excelente para la fabricación de todo tipo de biosensores electroquímicos, incluyendo tanto inmunosensores basados en formatos de tipo sándwich, para detección individual de alérgenos [Montiel, 2015^a], [Montiel, 2016^a] y biomarcadores cardíacos [Esteban-Fernández de Ávila, 2013], [Gamella, 2012] y de cáncer [Eletxigerra, 2016^a], [Taleat, 2013], y competitivos directos, mediante la inmovilización de anticuerpos sobre MBs funcionalizadas con ProtA (ProtA-MBs) [Esteban-Fernández de Ávila, 2012], [Moreno-Guzmán, 2010] y ProtG (ProtG-MBs) [Martínez-García, 2015], [Conzuelo, 2012], [Paniel, 2010], como sensores de DNA para la detección de patógenos [Campuzano, 2011^a], [Low, 2015], mutaciones genéticas [Ozka, 2017], [Esteban-Fernández de Ávila, 2015] y adulteraciones alimentarias [Montiel, 2017^a], [Montiel, 2017^b], mediante el empleo de oligonucleótidos biotinilados inmovilizados sobre MBs funcionalizadas con Estrep (Estrep-MBs). Las excelentes propiedades de estas partículas micrométricas también se han aprovechado para su integración en sistemas de flujo, dispositivos de microfluídica y sistemas de multidetección, disminuyendo el tiempo de ensayo, los volúmenes de muestra requeridos y proporcionando unas características analíticas adecuadas para la aplicación real de las metodologías desarrolladas [Dominguez, 2012], [Hervas, 2011], [Zhang, 2012^a], [Esteban-Fernández de Ávila, 2014], [Montiel, 2016^b], [Conzuelo, 2014]. Es importante mencionar que, aunque menos ampliamente, también se han descrito en la literatura biosensores de afinidad electroquímicos basados en el empleo de partículas nanomagnéticas que en general presentan mayores problemas de aglutinación, de efecto matriz y cuyos procesos de imantación requieren más tiempo y son menos eficientes [Serafín, 2017^a].

Todos estos antecedentes demuestran la gran versatilidad que ofrece este tipo de soportes micrométricos como base para el desarrollo de estrategias con excelentes características analíticas y aplicabilidad exitosa al análisis de dianas moleculares relevantes en ciencia médica y de la salud (biomarcadores de diagnóstico, hormonas y metabolitos), industria y fraude alimentario (alérgenos y control de calidad en alimentos), control

medioambiental (pesticidas y toxinas), etc, acoplables a todo tipo de nanomateriales y técnicas analíticas de detección.

La **Figura 6** muestra algunos ejemplos de MBs micromagnéticas funcionalizadas disponibles comercialmente para la inmovilización y/o reconocimiento de una gran variedad de analitos de interés.

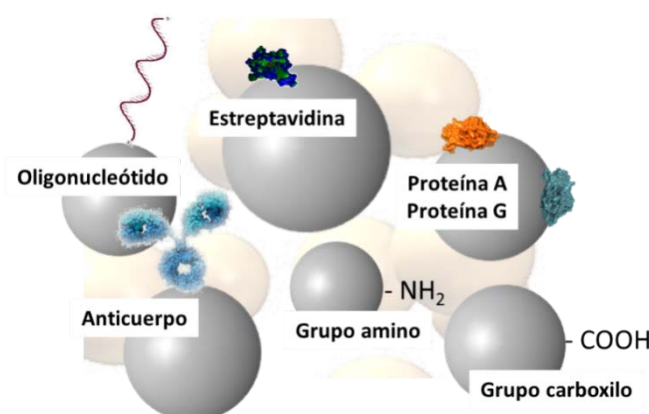


Figura 6: Partículas micromagnéticas (MBs) disponibles comercialmente funcionalizadas con distintos elementos de reconocimiento biológico y grupos funcionales.

Atendiendo al tipo de transductor, los biosensores pueden clasificarse en cinco grandes grupos: electroquímicos, eléctricos, ópticos, piezoeléctricos y térmicos [Monošík, 2012], de los cuales, los electroquímicos, basados en la interacción con el analito diana y en la producción de una señal eléctrica proporcional a su concentración, son unos de los más prometedores para la fabricación de dispositivos portátiles miniaturizables de bajo coste con aplicaciones asociadas al control de calidad, a la monitorización ambiental y al diagnóstico clínico.

Ya que, normalmente, estas reacciones se detectan en las proximidades de la superficie del electrodo, el tipo de material, dimensiones y modificaciones llevadas a cabo en su superficie afectan directamente a la respuesta obtenida. Las técnicas electroquímicas de análisis se basan en el empleo de un electrodo de referencia (RE) que mantiene el potencial estable, comúnmente de Ag/AgCl y colocado a una cierta distancia del electrodo de trabajo (WE), que actúa como transductor en la reacción bioquímica, fabricado a partir de distintos materiales como platino, oro, carbono (grafito), etc, y un electrodo auxiliar (AE) en contacto con la disolución del electrolito soporte que permite la aplicación de corriente/potencial al

electrodo de trabajo [Grieshaber, 2008]. Entre las ventajas más generales de las técnicas electroquímicas destaca el hecho de que son mínimamente dependientes del volumen de reacción y no se ven afectadas por la presencia de agentes cromóforos o fluoróforos (empleados en inmunoensayos homogéneos), lo que hace posible su aplicación a la detección de analitos contenidos en muestras turbias o coloreadas [Ronkainen, 2010], como la sangre.

En función de la técnica de detección empleada, los sensores electroquímicos se clasifican en amperométricos, potenciométricos e impedimétricos, aunque existen otras variantes menos empleadas [Hammond, 2016].

- Los **biosensores amperométricos** se basan en la monitorización de las corrientes faradaicas que resultan de procesos de oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva, produciéndose intercambios electrónicos entre el sistema biológico y el transductor [Reviejo, 2000]. Este proceso de detección se lleva a cabo, normalmente, a un potencial fijo aplicado al de trabajo o a un array de electrodos, con respecto al electrodo de referencia.

La Ley de Faraday demuestra que la intensidad de corriente es directamente proporcional a la velocidad de los procesos electroquímicos de oxidación o reducción del analito, que a su vez dependen de la velocidad de la transferencia electrónica hacia la superficie del transductor y de la velocidad del transporte de masa del analito, en función de los fenómenos de difusión, convección y migración, así como de la concentración del mismo. En presencia de un electrolito soporte y agitación controlada, es posible minimizar los fenómenos de migración, manteniendo constantes los de convección. Bajo estas condiciones se genera una capa de grosor L , donde la concentración del analito es prácticamente nula ya que todo lo que difunde reacciona sobre la superficie del electrodo, de manera que la intensidad de corriente obtenida en el estado estacionario (I) resulta directamente proporcional a la concentración (C) de la especie electroactiva [Alvarez-Icaza, 1993], [Albery, 1981], [Thevenot, 2001]. Los electrones transferidos hacia o desde la superficie del transductor pueden ser generados por enzimas de tipo oxidorreductasas, entre otras. Dependiendo del acoplamiento electrónico que tiene lugar en la superficie del electrodo de trabajo, los biosensores amperométricos se clasifican en:

- Biosensores de *primera generación*, donde la transferencia electrónica entre la especie activa y el electrodo es directa en base a las propiedades electroactivas del sustrato de la enzima o del producto formado.

- Biosensores de *segunda generación*, que emplean moléculas pequeñas con propiedades redox (mediadores) que mejoran tanto la sensibilidad como la relación señal/ruido obtenida. Algunos ejemplos de mediadores incluyen ferroceno, tionina, azul de metileno, viológeno de metilo, etc., cuyo funcionamiento reside en el intercambio de electrones entre el electrodo y la enzima, aceptando electrones por parte del transductor y aportándolos al centro activo de la enzima, o al revés. Aunque los mediadores electroquímicos suelen emplearse en disolución, también pueden estar inmovilizados en la superficie del transductor [Song, 2006] o integrados en materiales como pasta de carbono. Las características más importantes que deben presentar los mediadores redox para su funcionamiento correcto y efectivo son: i) rápida transferencia electrónica (K_{ET}), ii) bajo potencial redox de actuación (evitando procesos de co-oxidación y/o co-reducción de posibles interferentes), iii) estabilidad química tanto de su forma oxidada como reducida y iv) bajas energías de reorganización para que el proceso de transferencia electrónica ocurra de manera rápida [Ivanova, 2003].

- Biosensores de *tercera generación*, basados en la transferencia electrónica directa (DET) entre la superficie del electrodo y biomoléculas electroquímicamente activas inmovilizadas sobre su superficie. Dado que la mayoría de las enzimas no exhiben DET en superficies electródicas, uno de los mayores esfuerzos en este campo es favorecer estos procesos de transporte, y la búsqueda de nuevas proteínas con propiedades de transferencia electrónica directa [Zhang, 2004].

- Los **biosensores potenciométricos** se basan en la medida del potencial del electrodo de trabajo en una situación de equilibrio, es decir, en ausencia de flujo de corriente en el sistema. La relación entre la variación del potencial en la interfase del electrodo y la actividad de las especies en la fase de la muestra (s) y en la fase electródica (β) viene gobernada por la ecuación de Nerst:

$$E = E_0 + RT/Z_i F \ln (a_i^s/a_i^\beta)$$

siendo E_0 el potencial estándar del electrodo, a_i la actividad del ión, R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday y Z_i la valencia del ión [Wang, 2008³].

Entre los biosensores de tipo potenciométrico, conocidos como “biosensores de cuarta generación”, se encuentran aquellos basados en transistores de efecto campo (FET), que detectan la acumulación de carga en su superficie y pueden clasificarse como selectivos a iones (ISFET), enzimáticos (ENFET) e inmunológicos (IFET) [Arya, 2006].

- Los **biosensores impedimétricos** monitorizan las reacciones de bio-reconocimiento sobre la superficie del transductor mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). En general estos procesos de reconocimiento molecular aumentan la resistencia a la transferencia electrónica desde o hacia la superficie del electrodo, y pueden realizarse en ausencia (impedancia no faradaica) o en presencia (impedancia faradaica) de un par redox reversible. Estos últimos detectan procesos de bio-reconocimiento sobre el transductor a partir de cambios en la corriente faradaica (aumento de la resistencia a la transferencia de electrones en la interfase) como consecuencia del impedimento estérico causado por las interacciones biomoleculares y/o por la repulsión electrostática entre las cargas de las moléculas diana, o de la superficie, y las del par redox seleccionado para realizar la medida electroquímica [Bahadir, 2014].

La selección del material del que está compuesto el WE es un aspecto crítico en el desarrollo de todo tipo de biosensores electroquímicos. Algunas de las características principales a tener en cuenta para su elección incluyen: un comportamiento redox favorable y reproducible, una amplia ventana de potencial, coste asequible, geometría moldeable, baja toxicidad y sencilla renovación. Entre los materiales más empleados en los WE se encuentran carbono, oro, platino y mercurio. El platino es bastante inerte desde el punto de vista electroquímico, pero también bastante costoso, y pequeñas cantidades de agua o ácidos en la disolución del electrolito pueden enmascarar la señal analítica obtenida, mientras que los electrodos de oro, aunque presentan uso limitado en el rango de potenciales positivos debido a la posible oxidación de su superficie, son ampliamente utilizados para el desarrollo de biosensores basados en SAMs [Kelly, 2009].

Por el contrario, los electrodos basados en materiales de carbono (carbono vitrificado, pasta de carbono, etc.) presentan características y propiedades de gran atractivo como bajo coste, elevada estabilidad química, amplia ventana de potencial y actividad electrocatalítica, lo que les hace materiales idóneos para la fabricación de transductores electroquímicos. Además de los materiales de carbono tradicionales, el grafeno, CNTs en todas sus modalidades y los materiales de carbono nanoporosos con tamaños nanométricos y estructuras especiales, muestran propiedades electroquímicas y características mecánicas, geométricas, electrónicas y químicas únicas [Zhang, 2016^a].

Sin embargo, aunque en los últimos años se han mejorado notablemente aspectos relacionados con la reproducibilidad, rango de potencial operable y control de las corrientes de fondo proporcionadas por el material electródico, los electrodos convencionales también presentan importantes limitaciones desde el punto de vista de portabilidad, coste, volúmenes de muestra requeridos y ejecución de análisis *in situ* [Vasilescu, 2016]. En este sentido, la tecnología de serigrafiado permite la fabricación de electrodos impresos (“screen-printed electrodes” o SPEs) de una manera sencilla y empleando instrumental de bajo coste. Los SPEs, que incluyen el RE, AE y WE, han demostrado, además de mejoras sustanciales en los límites de detección y sensibilidad, mayor facilidad para su integración en dispositivos automáticos que los electrodos convencionales. La fabricación de estos transductores desechables, realizada mediante la deposición sucesiva de capas de tintas sobre un sustrato sólido, permite realizar modificaciones adaptadas a las demandas de análisis minimizando problemas clásicos de efecto memoria [Alonso-Lomillo, 2010].

Las características que ofrecen los SPEs les hace especialmente interesantes desde el punto de vista económico y de producción en masa para satisfacer los requerimientos de portabilidad necesarios para la realización de análisis descentralizados [Hayat, 2014] y el trabajo con volúmenes limitados de muestra. Además, esta tecnología permite la fabricación de dispositivos con 2, 4, 8 y hasta 96 superficies transductoras de trabajo de materiales como carbono, oro y platino, que pueden ser funcionalizadas de manera sencilla con una gran variedad de nanomateriales (CNTs, grafeno, AuNPs), proteínas (Estrep) o combinaciones de ellos para la detección simultánea de toda una batería de biomarcadores y analitos de interés, de manera sensible, selectiva y reproducible. En la **Figura 7** se muestran diversos ejemplos de superficies electródicas basadas en la tecnología SPE.



Figura 7: Plataformas con distintas superficies electródicas basadas en la tecnología SPE.

Dadas las excelentes propiedades y ventajas que ofrece esta tecnología, cada vez son más frecuentes los biosensores electroquímicos desechables basados en estos transductores para el desarrollo de dispositivos sensibles y reproducibles, combinados con todo tipo de nanomateriales y estructuras nanométricas, para la detección de dianas moleculares relevantes, tanto en el campo clínico, mediante la detección y análisis de biomarcadores cardiacos [Serafín, 2017^b], biomarcadores de obesidad [Martínez-García, 2017], [Guerrero, 2015] y de inflamación [Ojeda, 2014^a], [Sánchez-Tirado, 2017], como en el de seguridad alimentaria, mediante la detección de alérgenos [Montiel, 2015^b], [Montiel, 2016^c] y adulteraciones [Montiel, 2017^a] en todo tipo de matrices alimentarias.

El acoplamiento de MBs a plataformas electroquímicas desechables resulta una combinación ideal para la fabricación de biosensores electroquímicos basados en todo tipo de formatos de reconocimiento molecular, para la determinación simple, sensible y selectiva de analitos de diferente nivel molecular incluso en matrices complejas, en comparación con otras técnicas convencionales de análisis como los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y las metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Yáñez-Sedeño, 2016]. Estos biosensores basados en la combinación de MBs y SPEs se ofrecen como herramientas bioanalíticas capaces de proporcionar, de forma sencilla, resultados en tiempo real con enormes posibilidades para su implementación en dispositivos de control y diagnóstico POC.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en el desarrollo de metodologías electroanalíticas sencillas y con aplicabilidad real, para la detección sensible y selectiva de biomarcadores de cáncer de distinto nivel molecular, en la **Tabla 1** se resumen las principales características de los biosensores electroquímicos más

representativos descritos en los últimos diez años para la determinación de este tipo de entidades moleculares asociadas al desarrollo de distintas neoplasias, empleando toda una variedad de nanomateriales, bio-receptores, formatos de bioensayo, superficies transductoras y técnicas electroanalíticas de detección. Como puede observarse en la **Tabla 1**, todas estas metodologías han demostrado su aplicabilidad real mediante el análisis de cada uno de los biomarcadores objetivo en muestras clínicas de complejidad considerable.

Tabla 1: Biosensores electroquímicos para la determinación de biomarcadores de cáncer circulantes.

Soporte	Tipo de inmovilización	Tipo de (Bio)ensayo	Analito	Transductor	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
Au/PNA	Interacción SH-Au	Hibridación directa PNA/mRNA diana	Genes de fusión <i>TMPRSS2:ERG</i>	Nanoalambres de oro	DPV	mRNA extraído de células de cáncer de próstata (VCaP) y RNA _t extraído de tejidos tumorales frescos de próstata	$\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	100 fM	[Fang, 2009]
CTES/ITO	Enlace covalente (EDC/NHS)	Reconocimiento Ag–Ab	SOX-2	ITO	EIS	Suero humano enriquecido	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	7 fg mL ⁻¹	[Aydin, 2017]
Au/Cp-DNA	Interacción SH-Au	Hibridación directa Cp-DNA/miRNA	miRNA-155	SPAUE	SWV y EIS (0.1 Hz – 100 mHz)	Suero humano enriquecido y extractos de células MCF-7	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	5.7 aM (EIS) 0.18 aM (SWV)	[Cardoso, 2016]
Estrep-MBs/b-Cp-DNA	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)	Hibridación directa b-Cp-DNA/miRNA	miRNA-222	SPCE	Cronoamperometría ($E_{\text{app}} = 0.25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) (p-aminofenol)	RNA _t extraído de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Calu 1, H460) y de glioblastoma (U87MG y T98G)	Estrep-AP	7 pmol L ⁻¹	[Betazzi, 2013]
Estrep-MBs/b-Cp-DNA	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)	Hibridación directa b-Cp-DNA/miRNA-21	miRNA-21	SPCE	Amperometría ($E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) (H ₂ O ₂ /HQ)	RNA _t extraído de líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7)	anti-FITC-HRP	0.2 nM	[Vargas, 2018]
Au/SAM/ α -CD9 Ab	Unión específica SAM-Ab	Sándwich	Exosomas	AuE	Amperometría ($E_{\text{app}} = -0.1 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$) (TMB)	Suero humano	α -mIgG-HRP	2×10^2 partículas μL^{-1}	[Doldán, 2016]
Tosyl-MBs/anti-EpCAM	Enlace covalente	Sándwich	CTC	SPCE	Cronoamperometría ($E_{\text{app}} = -1.0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$)	Líneas celulares de adenocarcinoma de colon (Caco-2)	anti-CEA-AuNPs	1.6×10^2 células	[Maltez-da Costa, 2012]

Tabla 1 (continuación): Biosensores electroquímicos para la determinación de biomarcadores de cáncer circulantes.

Soporte	Tipo de inmovilización	Tipo de (Bio)ensayo	Analito	Transductor	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
HOOC-MBs/anti-TNF- α	Enlace covalente (EDC/NHSS)	Sándwich	TNF- α	SPCE	Amperometría ($E_{app} = -0.2$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2 /HQ)	Suero humano	Estrep-HRP	2 pg mL ⁻¹	[Eletxigerra, 2014]
Nanoestructuras de zirconio modificadas con serina (Serina/nZrO ₂)	Enlace covalente (EDC/NHS)	Reconocimiento Ag-Ab	CYFRA-21-1	ITO	DPV	Saliva de pacientes con cáncer oral	[Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	0.01 ng mL ⁻¹	[Kumar, 2016]
ProtG-MBs/anti-MUC1	Unión específica orientada (ProtG)	Sándwich	Mucina1 (MUC1)	SPGE	DPV (naftilfosfato)	Suero humano	Anticuerpo policlonal anti-conejo (p-anti-IgG-AP)	0.19 nM (Ab) 0.07 nM (aptámero)	[Florea, 2015]
Estrep-MBs/aptámeros	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)						Estrept-AP		
Estrep-MBs/b-Cp-DNA	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)	Hibridación directa b-Cp-DNA/gen	<i>RASSF1A</i> <i>MGMT</i>	SPCE	Amperometría ($E_{app} = -0.2$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2 /HQ)	Suero, saliva y orina humanas enriquecidas con <i>RASSF1A</i>	anti-IgG-HRP anti-ssDNA-HRP	42 pM (<i>RASSF1A</i>) 26 pM (<i>MGMT</i>)	[Povedano, 2018 ^a]
HOOC-MBs/anti-5-mC	Enlace covalente (EDC/NHSS)	Reconocimiento anti-5-mC/C						0.6 pM (<i>RASSF1A</i>)	
HOOC-MBs/anti-5-mC	Enlace covalente EDC/NHSS	Inmuno-DNA	<i>MGMT</i>	SPCE	Amperometría ($E_{app} = -0.2$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2 /HQ)	Suero y DNA _g extraído de células de glioblastoma (U87MG) y de tejidos cerebrales paraformados de glioblastoma	Estrep-HRP	1.2 pM	[Povedano, 2018 ^b]
Estrep-MBs/b-Cp-DNA	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)	Hibridación directa b-Cp-DNA/amplicón	HPV16 HPV18	SPCE (x8)	Cronoamperometría ($E_{app} = -0.3$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2 /HQ)	DNA _t extraído de líneas celulares de cáncer de cuello uterino (CaSki, SiHa, HeLa, C4I)	anti-DIG-HRP	0.1 ng DNA _t	[Bartosik, 2018]

Abreviaturas utilizadas: **Ab**: anticuerpo; **Ag–Ab**: complejo antígeno-anticuerpo; **anti-5-mC**: anticuerpo específico a 5 metil-citosina; **AP**: fosfatasa alcalina; **Au**: oro; **AuE**: electrodo de oro; **b-Cp-DNA**: sonda de captura de DNA biotinilada; **CYFRA-21:-1**: fragmento de citoqueratina 21-1; **Cp-DNA**: sonda de captura de DNA; **CTC**: células tumorales circulantes; **CTES**: carboxietil silanotriol; **DIG**: digoxigenina; **DPV**: voltamperometría diferencial de impulsos; **E_{app}**: potencial aplicado; **EDC**: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; **EIS**: espectroscopía de impedancia electroquímica; **Estrep**: estreptavidina; **FITC**: isotiocianato de fluoresceína; **HPV16**: genotipo 16 del virus del papiloma humano; **HPV18**: genotipo 18 del virus del papiloma humano; **HQ**: hidroquinona; **HRP**: peroxidasa de rábano; **IgG**: inmunoglobulina G; **ITO**: óxido de indio y estaño; **LD**: límite de detección; **MBs**: partículas magnéticas; **MGMT**: O6-metilguanina-DNA metiltransferasa; **mRNA**: RNA mensajero; **miRNA**: micro-RNA; **NHS**: N-hidroxisuccinimida; **NHSS**: N-hidroxisulfo-succinimida; **PNA**: ácido nucleico peptídico; **ProtG**: proteína G; **RASSF1A**: isoforma A del gen efector de Ras (Ras association domain family 1 isoform A); **RNA_t**: RNA total; **SAM**: monocapa autoensamblada; **SH**: grupo tiol; **SOX-2**: factor de transcripción SOX-2; **SPAuE**: electrodo serigrafiado de oro; **SPCE**: electrodo serigrafiado de carbono; **SPGE**: electrodo serigrafiado de grafito; **ss-DNA**: secuencia sencilla de DNA; **SWV**: voltamperometría de onda cuadrada; **TMB**: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; **TNF-α**: factor de necrosis tumoral alpha.

La mayor parte de estas metodologías proporcionan ventajas muy atractivas en términos de simplicidad, coste, tiempo de ensayo y portabilidad con respecto a las metodologías convencionales para la determinación de estos biomarcadores de gran relevancia en procesos cancerígenos. Así, por ejemplo, Eletxigerra y col., desarrollaron un inmunosensor amperométrico basado en una configuración tipo sándwich para la determinación de la citoquina pro-inflamatoria TNF en muestras de suero humano, empleando HOOC-MBs para la inmovilización covalente de anticuerpos de captura específicos y SPCEs como transductores electroquímicos. El límite de detección (LD) alcanzado en suero resultó ser adecuado para la determinación de este biomarcador a niveles clínicamente relevantes y esta plataforma inmunosensora demostró su aplicabilidad práctica para la determinación de TNF en muestras de suero humano contaminadas a dos niveles diferentes, optimizando previamente la composición de una disolución mezcla que contenía NaCl (1 M), Tween-20® (2 %) y BSA (0.5 %) para la minimización de adsorciones inespecíficas iónicas e hidrofóbicas observadas en esta matriz biológica tan compleja [Eletxigerra, 2014].

Adicionalmente a los biomarcadores de naturaleza proteica, los biosensores electroquímicos también se han aplicado de manera exitosa a la detección de biomarcadores genéticos. Ejemplos de ello son los trabajos descritos por Betazzi y col. [Betazzi, 2013] y Vargas y col. [Vargas, 2018], en los que emplean sencillas metodologías para detectar miRNAs en muestras de RNA_t extraído de células de cáncer de pulmón y glioblastoma, y cáncer de mama, respectivamente.

Bettazi y col. [Betazzi, 2013], desarrollaron un biosensor electroquímico para la detección de miRNA-222 basado en el empleo de Estrep-MBs, SPCEs y DPV. Tras la inmovilización de la sonda de captura biotinilada de DNA (b-Cp) y el bloqueo de los sitios libres de estreptavidina de las MBs, se lleva a cabo la hibridación selectiva con el miRNA diana o con el RNA_t extraído de líneas celulares de cáncer de pulmón (Calu1 y H460) y de glioblastoma (U87MG y T98G), previamente biotinilados empleando una enzima terminal tipo transferasa para, a continuación, monitorizar la oxidación del sustrato α -naftil fosfato a α -naftol, previo marcaje enzimático de los heterohíbridos b-Cp-miRNA-222-b con un conjugado de estreptavidina-AP (Estrep-AP). Los autores implementaron además esta metodología en un chip comercial de microfluídica basado en fuerzas naturales y provisto de microelectrodos de

oro que permitía el análisis de 8 muestras simultáneamente y la regeneración del sistema por simples lavados.

Muy recientemente, Vargas y col. [Vargas, 2018] han desarrollado un biosensor amperométrico basado en un formato de hibridación de tipo competitivo en el que el miRNA diana compite con un miRNA de idéntica secuencia, pero modificado en uno de sus extremos con FITC (miRNA-21-FITC), por hibridar con sondas de captura de DNA biotiniladas complementarias (b-Cp), previamente inmovilizadas sobre Estrep-MBs (b-Cp-MBs). Tras el marcaje del miRNA-21-FITC inmovilizado sobre las MBs con fragmentos Fab anti-FITC conjugados a HRP (anti-FITC-HRP Fab) se capturan las MBs modificadas sobre la superficie de SPCEs y se realiza la transducción amperométrica en presencia de H_2O_2 /HQ. De acuerdo con el fundamento del ensayo, a medida que aumenta la concentración de miRNA-21 en la muestra analizada, menor es la cantidad de miRNA-21-FITC inmovilizado sobre la superficie de las MBs, y por tanto, de anti-FITC-HRP Fab, produciéndose una disminución en la señal amperométrica obtenida. Esta sencilla metodología, en la que la detección del miRNA objetivo se lleva a cabo en una única etapa, sin amplificación y a temperatura ambiente, demostró un LD de 0.2 nM, un rango lineal operacional de 0.7–10.0 nM para el miRNA diana sintético (miRNA-21), una elevada reproducibilidad de los protocolos de modificación de las MBs, desarrollo del ensayo y transducción amperométrica ($RSD_{n=10} = 3.3\%$) y una selectividad aceptable frente a secuencias diana con una única base desapareada. Los resultados obtenidos demuestran además una estabilidad de almacenamiento de 49 días de las b-Cp-MBs y la fiabilidad de la metodología desarrollada para la determinación del contenido endógeno de miRNA-21 en RNA_t extraído de células de cáncer de mama (MCF-7) y células epiteliales no tumorales (MCF-10 A).

Otros de los trabajos más recientes y relevantes son los descritos por Povedano y col. [Povedano, 2018^a], [Povedano, 2018^b] en el que se desarrollan tres plataformas biosensoras amperométricas diferentes que permiten determinar de manera sencilla, sin necesidad de PCR ni pretratamientos laboriosos de muestra, la presencia de 5 metilcitosinas (5-mCs) en secuencias de DNA, empleando como modelo las secuencias sintéticas metiladas de las regiones promotoras de dos genes supresores de tumores: *RASSF1A* y *MGMT*.

La primera estrategia (inmunosensor tipo sándwich) se basa en el uso de dos anticuerpos diferentes, uno de ellos inmovilizado covalentemente en la superficie de HOOC-MBs, específico para 5-mCs (anti-5-mC) y capaz de capturar cualquier secuencia monocatenaria de DNA portadora de este tipo de metilación. El otro anticuerpo, conjugado con la enzima HRP, y empleado como anticuerpo de detección, es capaz de detectar cualquier secuencia de DNA de cadena sencilla [Povedano, 2018^a]. La segunda estrategia (sensor de DNA) consiste en la inmovilización de una sonda de captura de DNA biotinilada, específica de la secuencia metilada que debe detectarse, en la superficie de Estrep-MBs. En este caso, las metilaciones en el DNA capturado se reconocen utilizando el mismo anticuerpo específico para 5-mC (empleado como anticuerpo de captura en el inmunosensor) marcado con un anticuerpo secundario conjugado con HRP [Povedano, 2018^a]. En la tercera estrategia (sensor de inmuno-DNA) el DNA metilado capturado por anti-5-mC-MBs se detecta selectivamente con una sonda de DNA biotinilada específica conjugada con un polímero de estreptavidina-HRP (Estrep-HRP) [Povedano, 2018^b]. En estas tres estrategias los bioconjugados resultantes son capturados magnéticamente sobre la superficie de los electrodos impresos y se realiza la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2/HQ .

Las características analíticas obtenidas con las metodologías desarrolladas en sus condiciones óptimas para la detección amperométrica de las secuencias sintéticas metiladas de la región promotora de ambos genes, demuestran una buena reproducibilidad en todo el proceso y un amplio intervalo lineal que permite su determinación a nivel picomolar. Cabe destacar que los resultados obtenidos empleando el mismo estándar demostraron que el inmunosensor proporcionaba un LD 2500 veces menor y en un tiempo de ensayo 4 veces inferior que la metodología ELISA comercial.

Los estudios de selectividad realizados con estándares de DNA sintético que contenían citosinas no modificadas, 5-mCs o 5-hidroximetilcitosinas (5-hmCs) demostraron la especificidad de estas metodologías para detectar únicamente secuencias de oligonucleótidos monocatenarios con 5-mCs. Además, de acuerdo con los fundamentos de cada estrategia se demostró que mientras que el inmunosensor detecta la presencia de cualquier oligonucleótido monocatenario con la metilación diana, los sensores de DNA e inmuno-DNA solo reconocen la secuencia metilada complementaria a la sonda de DNA sintética empleada.

Estos resultados, en conjunto con la versatilidad que ofrecen estas metodologías, simplemente cambiando la sonda sintética de DNA, abren un tremendo abanico de posibilidades para el multiplexado, tanto de metilaciones en distintos genes, como en diferentes regiones de un mismo gen.

Teniendo la mejor discriminación y selectividad, se demostró la aplicabilidad de los sensores de DNA y de inmuno-DNA analizando fluidos biológicos suplementados y DNA genómico extraído de células y tejidos tumorales.

El potencial de estas plataformas biosensoras para la determinación a bajos niveles y con buenas recuperaciones de las secuencias sintéticas metiladas, quedó demostrado mediante los resultados obtenidos en muestras biológicas (orina, saliva y suero humano) diluidas al 25 % [Povedano, 2018^a] o directamente en muestras de suero sin diluir [Povedano, 2018^b] y sin necesidad de realizar una extracción previa de DNA en muestras suplementadas con la secuencia sintética metilada promotora del gen *RASSF1A*, lo que resulta especialmente relevante teniendo en cuenta que, hasta el momento, los escasos biosensores descritos y las metodologías comerciales para el análisis de este tipo de muestras han demostrado ser aplicables previa amplificación o extracción del material genético.

Por otro lado, los sensores de DNA y de inmuno-DNA se aplicaron a la determinación del estado de metilación en la región promotora del gen *MGMT* en DNA genómico extraído de líneas celulares y de tejidos cerebrales parafinados de pacientes diagnosticados con glioblastoma de grado IV.

Los resultados obtenidos en células demostraron respuestas amperométricas significativas únicamente para el DNA extraído de células U87 en comparación con el extraído de células HeLa, lo que está de acuerdo con la hipermetilación específica del promotor de *MGMT* en estas células de glioblastoma humano.

En el análisis de tejidos cerebrales, los resultados proporcionados por el biosensor mostraron señales significativamente superiores solo en 2 de las 4 muestras analizadas. Estos resultados eran perfectamente consistentes con la presencia de metilaciones en el promotor de este gen identificado por la estrategia convencional empleada en los hospitales para estas determinaciones, basada en qRT-PCR, solo en estas mismas dos muestras.

A diferencia de la metilación en el promotor del gen *RASSF1A*, que se considera un biomarcador de diagnóstico en bastantes tipos de cánceres humanos, en el caso del gen *MGMT* la presencia de metilación en su región promotora se considera un predictor útil de la respuesta del paciente a la acción de los agentes alquilantes, por lo que los resultados presentados justifican las aplicaciones de estas bioplataformas, tanto para acciones diagnósticas como terapéuticas, de gran relevancia en procesos cancerígenos.

Las características analíticas y la aplicabilidad demostradas hacen que estas nuevas metodologías sean herramientas muy atractivas frente a las estrategias disponibles para detectar procesos de metilación en DNA que precisan tratamientos especiales con bisulfitos y etapas previas de extracción y amplificación del material genético.

Los trabajos resumidos en la **Tabla 1** son solo una pequeña muestra del gran número de publicaciones científicas que describen el desarrollo y aplicación de biosensores basados en el empleo de MBs comercialmente convenientemente funcionalizadas como soportes sólidos, para la determinación de biomarcadores de cáncer de diversos niveles moleculares, abarcando desde proteínas [Florea, 2015], genes [Bartosik, 2016], [Bartosik, 2018] y pequeños RNAs no codificantes [Smerkova, 2015], [Betazzi, 2013], [Vargas, 2018], hasta CTCs, como el trabajo desarrollado por Maltez-da Costa y col. [Maltez-da Costa, 2012], en el que detectaron de manera sensible y selectiva células tumorales circulantes de adenocarcinoma de colon (Caco-2) empleando biosensores amperométricos basados en partículas magnéticas tosilladas (Tosyl-MBs) modificadas con anticuerpos específicos a la molécula de adhesión epitelial celular (anti-EpCAM) como elementos de captura, y AuNPs conjugadas con anticuerpos específicos para CEA (anti-CEA) como entidades detectoras, aprovechando sus propiedades electrocatalíticas para la generación de hidrógeno a partir de iones H^+ , empleando SPCEs como transductores electroquímicos.

Estos antecedentes demuestran sobradamente que el acoplamiento de diferentes técnicas electroanalíticas con la gran variedad de sustratos electródicos y de materiales nano- y micrométricos, que pueden modificarse de una manera rápida, sencilla y eficaz con un amplio espectro de moléculas biológicas y emplearse en distintos formatos de bioensayo, conduce al desarrollo de metodologías que satisfacen, de manera preferible a las estrategias convencionales, las demandas de la oncología clínica actual en términos de simplicidad, coste, tiempo de ensayo y análisis multiplexado y descentralizado. Por todo ello, la tecnología

basada en dispositivos de biosensorización electroquímica está experimentando una gran expansión en el campo de las pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT), presentándose como una metodología tremendamente prometedora para resolver, de manera satisfactoria, a corto-medio plazo los requerimientos de una atención personalizada de calidad, constantemente demandada por parte de la población.

2.3. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL

El diagnóstico y tratamiento de enfermedades, especialmente aquellas con elevada prevalencia y un alto índice de mortalidad como el cáncer, es uno de los campos en los que la tecnología de los biosensores electroquímicos está demostrando excelentes capacidades.

La enorme cantidad de trabajos publicados dedicados a la determinación de biomarcadores cancerígenos empleando plataformas biosensoras electroquímicas pone de manifiesto las tremendas posibilidades y la utilidad práctica que ofrecen estos dispositivos. Teniendo en cuenta que normalmente los biomarcadores se encuentran en un rango de concentración de sub-pg mL^{-1} – ng mL^{-1} , dependiendo del tipo de muestra, la determinación precisa de los mismos a los niveles requeridos y en presencia de otro tipo de biomoléculas, demandan metodologías que exhiban gran sensibilidad y selectividad.

Aunque una gran mayoría de estas herramientas electroquímicas han sido diseñadas para la determinación y monitorización particular de un único tipo de biomarcador, los grandes avances realizados en la tecnología de serigrafiado han facilitado enormemente el traslado de las estrategias individuales diseñadas y previamente optimizadas, sobre plataformas que permitan la determinación simultánea y en un único experimento de múltiples biomarcadores de distinto o del mismo nivel molecular.

2.3.1. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES PROTEICOS

Uno de los tipos de biomarcadores más convencionales y cuyos niveles de expresión resultan indicativos del estado de un gran número de enfermedades, son las proteínas [Chikkaveeraiah, 2012], definidas como los productos finales de un proceso de descodificación cuyo punto de partida es la información contenida en el DNA celular. Estas moléculas macroscópicas, consideradas como los elementos motores y estructurales de las

células, sirven como catalizadores de todo tipo de reacciones bioquímicas en cualquier organismo vivo.

El correcto funcionamiento de cualquier célula depende de miles de proteínas que deben ser expresadas a los niveles adecuados, transportadas a las localizaciones celulares apropiadas o incluso degradadas en el momento en el que la célula ya no requiera de sus funciones específicas, por lo que la síntesis proteica puede considerarse como uno de los mecanismos más complejos de la naturaleza [Jain, 2005].

Teniendo en cuenta que en ciertas ocasiones los cambios en los niveles de expresión de los genes no se correlacionan con la abundancia proteica, la proteómica, el análisis y cuantificación de proteínas, ofrece una valiosa información en cuanto a la aparición, progreso y grado de malignidad de enfermedades carcinogénicas [Khadir, 2013]. Además, puesto que algunas alteraciones específicas asociadas al desarrollo de cáncer ocurren a nivel proteico o como consecuencia de modificaciones post-traduccionales de las proteínas (fosforilación, glicosilación, acetilación, ruptura proteolítica, etc.) [Wu, 2007], y dado que únicamente la versión modificada o alterada de una proteína puede ser específica del desarrollo de una enfermedad [Tainsky, 2009], la determinación específica de estos biomarcadores es una de las metodologías más demandadas.

Entre los métodos más comunes empleados para la detección y análisis de biomarcadores proteicos se encuentran los ensayos basados en inmunohistoquímica (IHC), los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (o metodologías ELISA por sus siglas en inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays”), la citometría de flujo (CMF), los ensayos de proximidad (PLA), los microarrays de proteínas y la espectrometría de masas (MS) [Powers, 2012].

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC):

Las técnicas de IHC se basan en la especificidad y afinidad de anticuerpos que reconocen y permiten llevar a cabo la localización tisular de las moléculas de interés (antígenos), en muestras frescas, congeladas e incluso fijadas en parafina. La visualización de las uniones Ag–Ab se realiza empleando como marcadores moléculas fluorescentes (fluoresceína y rodamina), enzimas, iones metálicos en forma coloidal e incluso isótopos radiactivos. Pese a su simplicidad, las técnicas de IHC presentan limitaciones en cuanto al

desarrollo del proceso e interpretación de los resultados, que requieren de una gran experiencia para la ejecución de un correcto análisis final [de Matos, 2010]. Además, generalmente solo proporcionan información cualitativa o semi-cuantitativa.

ELISA:

El fundamento principal de los ensayos tipo ELISA consiste en el seguimiento de la reacción de reconocimiento Ag–Ab mediante cambios de color, empleando conjugados ligados a enzimas y un sustrato enzimático para la identificación de las moléculas de interés (antígenos (Ag) o anticuerpos (Ab)) en una muestra dada, a partir de la inmovilización de las entidades biológicas de reconocimiento sobre una fase sólida de poliestireno, polivinilo o polipropileno (conocida comúnmente como placa ELISA multipocillo). Entre las enzimas empleadas destacan beta-galactosidasa (β -gal), GOx, HRP y AP. La reacción entre la enzima y su sustrato se completa generalmente en 30–60 minutos, y los resultados finales se obtienen empleando un espectrofotómetro en un rango de longitud de onda comprendido entre 400–600 nm, dependiendo de las características del conjugado empleado [Aydin, 2015].

Los ensayos inmunológicos implicados en las metodologías ELISA pueden clasificarse en diferentes grupos (**Figura 8**), dependiendo del formato empleado para la medida del antígeno de interés:

1) Inmunoensayos basados en un formato *directo*, en los que el antígeno de interés se encuentra adsorbido sobre la superficie sólida y es directamente reconocido por su anticuerpo específico conjugado a la enzima de detección. A pesar de su rapidez y ausencia total de reactividad cruzada por parte de otros anticuerpos, la limitada flexibilidad en cuanto a la elección del sistema de detección enzima-sustrato, y el hecho de que el anticuerpo primario deba ser conjugado a la enzima de manera individual, son algunos de los principales inconvenientes de este formato.

2) Inmunoensayos basados en un formato *indirecto*, cuyo fundamento consiste en el reconocimiento del antígeno de interés, adsorbido sobre la superficie sólida, por un anticuerpo específico primario que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a la enzima correspondiente. En este caso, a diferencia de los formatos directos, el anticuerpo primario presenta más sitios de unión por el anticuerpo secundario que por el

antígeno inmovilizado, lo que se traduce en la obtención de señales considerablemente amplificadas.

3) Inmunoensayos basados en un formato *no competitivo* (o “sándwich”), en el que se requieren dos anticuerpos que reconocen regiones diferentes del analito. Este formato, a diferencia del formato competitivo, se emplea para la detección de analitos de mayor tamaño que puedan ser reconocidos por dos anticuerpos diferentes. En los ensayos tipo sándwich, normalmente se inmoviliza un exceso de anticuerpo de captura sobre una superficie sólida que reconocerá de manera específica al analito contenido en la muestra problema. A continuación, se añade al sistema un anticuerpo secundario conjugado a la enzima de detección que reconoce de manera específica al analito previamente capturado, formando un “sándwich”. En presencia del sustrato correspondiente, la señal obtenida resulta directamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

4) Inmunoensayos basados en un formato *competitivo*, normalmente empleado para la determinación de analitos de bajo peso molecular. Estos formatos requieren un único anticuerpo y una versión del antígeno de interés modificado de forma que el analito presente en la muestra problema compite con el analito marcado por unirse a los sitios de libres del anticuerpo específico. Si la señal es generada como consecuencia de la unión del analito marcado al anticuerpo, ésta será inversamente proporcional a la concentración del analito libre en la muestra y si, por el contrario, la señal se genera a partir del analito marcado que no se ha unido al anticuerpo, ésta resulta directamente proporcional a la concentración del analito objeto de análisis.

Dependiendo de la existencia o ausencia de etapas de separación, los inmunoensayos pueden clasificarse en ensayos homogéneos y heterogéneos. Mientras que en los ensayos homogéneos no es necesario llevar a cabo una etapa de separación entre el complejo Ag–Ab y el antígeno libre, en los heterogéneos, donde se incluyen los ensayos tipo ELISA, tras el proceso de reconocimiento Ag–Ab y antes de llevar a cabo la medida de la señal, el antígeno libre en disolución debe ser separado del complejo formado, minimizando posibles interferencias por parte de otras sustancias o especies presentes en la muestra [Dinis-Oliveira, 2014].

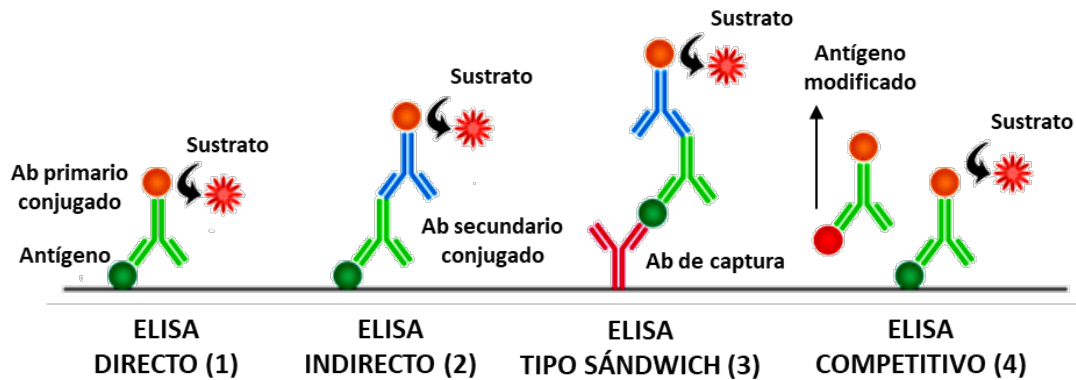


Figura 8: Principales formatos de inmunoensayos tipo ELISA.

Aunque los resultados obtenidos mediante la metodología ELISA suelen ser reproducibles, estos métodos presentan como inconvenientes principales el tiempo de ensayo, la necesidad de realizar numerosas etapas de incubación y lavados, de emplear instrumentación compleja disponible solo en entornos descentralizados y sus limitadas capacidades de multiplexado. Además, es importante tener en cuenta la posibilidad de obtener diferencias significativas entre los resultados que proporcionan distintos ensayos ELISA para la determinación de un mismo biomarcador [Leng, 2008], así como la posible obtención de falsos positivos como consecuencia de interacciones no específicas con otras especies involucradas en el ensayo [Gan, 2013].

CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF):

La CMF permite la determinación cualitativa y cuantitativa de células enteras en suspensión o constituyentes celulares, empleando marcadores y anticuerpos monoclonales [Jaroszeski, 1999] unidos a fluorocromos que se detectan finalmente empleando sistemas informáticos apropiados. Esta técnica permite analizar aproximadamente 5000 partículas biológicas en suspensión por segundo, para la identificación de antígenos o biomarcadores presentes en la superficie o en el citoplasma celular [Suárez, 2015]. El fundamento principal de la CMF consiste en un sistema de fluídica que dirige la suspensión de la muestra hacia una fuente de luz, registrándose la luz dispersada o fluorescente emitida a un sistema electrónico que convierte las señales obtenidas en datos digitales proporcionales a la intensidad luminosa obtenida [Adan, 2017]. Aunque esta técnica presenta varias aplicaciones en clínica, es bastante laboriosa, requiere gran entrenamiento por parte del usuario [Bakke, 2001] y no

permite la visualización de células malignas [Bakke, 2000], limitando su utilidad al análisis de tumores sólidos [Sun, 2010].

OTRAS METODOLOGÍAS:

Otras técnicas aplicables a la detección de biomarcadores proteicos incluyen las basadas en PLA, microarrays de proteínas y MS.

En los ensayos PLA, secuencias de oligonucleótidos complementarias entre sí se unen a anticuerpos específicos que reconocen dos o más epítopos de la proteína objetivo, y se amplifican mediante técnicas de PCR en tiempo real, de amplificación por círculo rodante (RCA, del inglés “rolling circle amplification”) [Blokzijl, 2010] y de otros métodos de amplificación isoterma, generando señales como consecuencia de la presencia de la proteína diana, de modificaciones de la misma o de interacciones de tipo proteína–proteína [Greenwood, 2015].

Los microarrays de proteínas, aunque tienen un coste elevado, requieren menor cantidad de muestra y presentan una portabilidad y transporte más asequible que los métodos anteriores. La detección proteica mediante estas técnicas consiste en la deposición de los elementos de captura sobre la superficie del microarray, captura de los analitos de interés, y reconocimiento final de los mismos mediante biomoléculas de detección (anticuerpos) convenientemente marcadas, llevándose a cabo un barrido de la superficie final del microarray mediante la emisión de un haz de luz láser que el detector traduce a intensidad píxel, correlacionada con la concentración de la diana molecular presente en la muestra [Sanz, 2010].

La MS permite detectar una amplia variedad de proteínas en un único barrido y sin necesidad de llevar a cabo ninguna etapa extra de marcaje [Powers, 2012], mediante la ionización y separación, en función de la relación masa/carga (m/z), de las moléculas de interés, que son detectadas y registradas mediante espectros en forma de picos cuya intensidad indica la abundancia relativa de los iones producidos [Gómez, 2010].

Es importante destacar que todas estas metodologías presentan desventajas asociadas al coste, tiempo de ensayo, robustez, sensibilidad, rendimiento, limitada portabilidad de la instrumentación requerida y a la gran cantidad de datos generados por

cada muestra analizada, que dificulta su evaluación e interpretación [Zatloukal, 2014], [Kodadek, 2001].

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETECCIÓN DE MARCADORES PROTEICOS

Gracias a su elevada sensibilidad, sencilla utilización, compatibilidad con sistemas de detección de coste asequible y fácil miniaturización y portabilidad [Wu, 2015^a], rápida respuesta, tiempos cortos de análisis y fiabilidad de los resultados proporcionados, los biosensores electroquímicos se consideran una de las metodologías más apropiadas para la detección individual o multiplexada de este tipo de biomarcadores [Gómez, 2015].

Los biosensores basados en interacciones de afinidad, caracterizados por su rapidez y selectividad, comprenden el empleo de proteínas de unión específica (como anticuerpos, lectinas y otras proteínas de afinidad bacterianas o virales), sondas de oligonucleótidos (en disposición lineal o en forma de horquilla), aptámeros o péptidos, como elementos de reconocimiento selectivos a la diana de interés. La selección de los bio-receptores de afinidad a emplear para el desarrollo de sistemas electroquímicos de biosensado depende de diversos factores, entre los que se incluyen su disponibilidad comercial, nivel molecular y tamaño y contenido endógeno del analito que se pretende detectar en las muestras seleccionadas [Campuzano, 2017^b].

Los biosensores basados en anticuerpos (inmunosensores), que destacan por su elevada especificidad y afinidad hacia sus antígenos proteicos específicos, son ampliamente utilizados para la determinación de marcadores tumorales [Farzin, 2018].

Los inmunosensores electroquímicos se basan principalmente en el empleo de anticuerpos policlonales (pAbs) y monoclonales (mAbs) como receptores de afinidad. Los pAbs comprenden un conjunto de anticuerpos provenientes de distintas células B capaces de reconocer múltiples epítopos del antígeno específico, mientras que los mAbs, producidos a partir de la misma célula B, reconocen el mismo epítipo del antígeno, y ofrecen, por lo general, mayor selectividad que los pAbs [Vestergaard, 2007]. Aunque tanto los mAbs como los pAbs presentan ventajas y desventajas en cuanto a su producción, costes y propiedades de enlace a sustancias antigénicas, la selección del tipo de anticuerpo depende principalmente de las características y requisitos específicos del ensayo, del antígeno diana y de las condiciones experimentales de trabajo a nivel de laboratorio.

Los aptámeros (receptores artificiales de DNA y RNA con elevada afinidad hacia sustratos orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular y hacia proteínas) [Zhao, 2010] se consideran uno de los principales competidores de los anticuerpos como elementos de reconocimiento biológico, debido a su estabilidad a altas temperaturas, coste, disponibilidad comercial y versatilidad de adaptación a distintas dianas y de conjugación con todo tipo de marcadores [Meirinho, 2016].

Las lectinas, proteínas naturales de origen no inmune con afinidad frente a fracciones específicas de carbohidratos, glicolípidos y glicoproteínas presentes en virus, bacterias, plantas y animales [Minko, 2004], presentan baja afinidad por carbohidratos ($K_d = 10^{-3}$ – 10^{-4} M) [Lieth, 2009] y, a diferencia de los anticuerpos, pueden emplearse incluso cuando las dianas de interés son desconocidas [Bertok, 2015].

Por otro lado, los péptidos (secuencias de unos 20–30 aminoácidos), que también han sido utilizados como bio-receptores dirigidos hacia biomarcadores tumorales [Castillo, 2013], [Karimzadeh, 2018], pueden ser sintetizados en grandes cantidades, pero su afinidad es menor que la de los anticuerpos [Farzin, 2018].

La combinación de estos elementos de bio-reconocimiento de gran especificidad, las ventajas intrínsecas de las técnicas electroquímicas, y la gran variedad de sustratos electródicos acoplables a diferentes tipos de nanomateriales y de formatos de bioensayo, hacen de los biosensores electroquímicos de afinidad herramientas muy prometedoras y eficaces, con excelentes capacidades analíticas y operacionales para el diagnóstico y control de enfermedades neoplásicas.

Como ya se ha comentado, una de las partes fundamentales de esta Tesis Doctoral comprende el desarrollo, optimización y demostración de la aplicabilidad real de nuevas metodologías electroquímicas para la determinación rápida, sencilla y a niveles clínicamente relevantes, de biomarcadores proteicos de importancia clínicamente aceptada o emergentes para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diversos tipos de neoplasias, entre los que destacan proteínas circulantes, receptores extracelulares e inmunoglobulinas específicas a antígenos asociados con la aparición y desarrollo de tumores. Los biomarcadores proteicos seleccionados como objetivo en esta Tesis Doctoral incluyen: fibrinógeno (Fbg), endoglina (CD105), receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER-2) y autoanticuerpos específicos contra la proteína p53. Con

el fin de justificar su selección, a continuación, se discutirán los aspectos clínicos más relevantes de cada uno de los biomarcadores diana seleccionados y las estrategias más relevantes de las que se dispone para su determinación, hasta el momento de redacción de esta Tesis Doctoral.

2.3.1.1. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO

El fibrinógeno (Fbg) es una glicoproteína de 340 kDa producida por las células hepáticas que actúa como un importante factor de coagulación y regulador de rutas hemostáticas. Una de las etapas finales del sistema hemostático es la conversión de Fbg a fibrina a través del efecto proteolítico de la trombina.

La estructura molecular del Fbg (**Figura 9**) está formada por dos grupos de tres cadenas polipeptídicas principales ($A\alpha$, $B\beta$ y γ) conectadas mediante enlaces de tipo disulfuro.

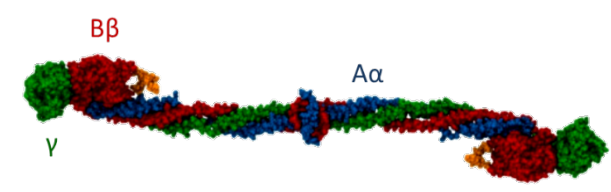


Figura 9: Estructura general del Fbg mostrando sus tres cadenas polipeptídicas principales.

Tanto el Fbg como la fibrina, y otros productos de su degradación, participan en una gran variedad de mecanismos biológicos, como procesos de coagulación, reparación de vasos sanguíneos dañados, migración y proliferación celular, procesos de angiogénesis y cicatrización de las heridas, de particular importancia en el desarrollo de tumores [Kołodziejczyk, 2013]. De hecho, algunos estudios han demostrado que el aumento en los niveles de expresión de Fbg estimula el crecimiento de las células cancerígenas, la progresión de la enfermedad y la aparición de metástasis [Yu, 2016^a].

La formación de tumores se asocia con episodios crónicos de inflamación dependientes de citoquinas y factores inflamatorios, que desencadenan la activación de plaquetas, la estimulación de cascadas de coagulación y la producción de fibrina, lo que demuestra la participación del Fbg y la fibrina en actividades pro-inflamatorias y su relación directa con el desarrollo de procesos cancerígenos y metastásicos [Kołodziejczyk, 2013].

La utilidad del Fbg como biomarcador de pronóstico independiente en pacientes con cáncer de colon, de mama y de pulmón también se ha demostrado en algunos trabajos publicados en los últimos años.

Sheng y col. [Sheng, 2013] demostraron una correlación directa entre los niveles séricos de Fbg y diferentes aspectos de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), encontrando un aumento significativo en los niveles de expresión del biomarcador en pacientes con tumores moderada o mínimamente diferenciados y en las etapas más avanzadas de la enfermedad.

Por otro lado, la relación que existe entre los niveles de expresión de Fbg y el pronóstico de cáncer de colon queda demostrada en el trabajo publicado por Sun y col. [Sun, 2014], cuyos resultados confirmaron el factor pronóstico de Fbg en muestras de plasma de pacientes con cáncer de colon, previa intervención quirúrgica, obteniéndose una mayor supervivencia global a 5 años (OS) y supervivencia libre de la enfermedad (DFS) en pacientes con menores niveles de Fbg. También se ha descrito una relación entre los niveles de Fbg y OS y DFS a 5 años en pacientes con cáncer cervical y de ovario.

Otros trabajos describen también la relación entre los niveles plasmáticos de Fbg y la supervivencia global de pacientes con cáncer de mama, tanto menor cuanto mayor son los niveles de esta proteína, demostrando resultados clínicos desfavorables para distintos subtipos de cáncer de mama (Luminal A, Luminal B y triple negativo (TNBC)) [Wen, 2015], lo que confirma el papel del Fbg como biomarcador de pronóstico independiente y de diana terapéutica de interés también en este tipo de neoplasia [Mei, 2016].

Entre los métodos convencionales para la determinación de Fbg, se encuentran los ensayos de Fbg total coagulable, los del índice de coagulación, los derivados de protrombina (PT-), distintas variantes de inmunoensayos (inmunodifusión radial (RID), ELISA o ensayos nefletométricos) [Lowe, 2004], electro-inmunoensayos y precipitación de proteínas por factores fisicoquímicos.

El método de recuperación de coágulo es el método de referencia para la determinación de Fbg y consiste en la cuantificación directa de la fibrina generada en los coágulos. Aunque es uno de los métodos más precisos y reproducibles, el procedimiento es bastante largo y por tanto poco apropiado para aplicaciones clínicas. Los ensayos derivados

de PT- estiman tanto el nivel de PT- como de Fbg a través de cambios de absorbancia relacionados con la concentración de Fbg [Miesbach, 2010]. En el ensayo funcional de Fbg (ensayo de Clauss), se determina el índice de conversión de Fbg en fibrina en presencia de un exceso de trombina, que produce la coagulación del plasma. En este método el nivel de Fbg resulta inversamente proporcional al tiempo de coagulación [Mackie, 2003].

La determinación de Fbg y del tiempo de coagulación se realiza mediante el empleo de coagulómetros automáticos y estrategias basadas en detección óptica y mecánica [Becker, 1984], [Hoffmann, 1988].

Generalmente los resultados que se obtienen en estos ensayos empleando distintos analizadores o reactivos son discrepantes, lo que dificulta su aplicación como dispositivos POC.

En este sentido, los biosensores de afinidad acoplados a técnicas de detección electroquímica se presentan como excelentes alternativas a estos métodos convencionales para determinar Fbg debido a algunas de sus características, comentadas anteriormente, entre las que destacan su elevada selectividad y sensibilidad, bajo coste y posibilidad de miniaturización.

En la **Tabla 2** se resumen algunas estrategias basadas en sistemas de biosensorización electroquímica para la determinación de Fbg en muestras reales de suero y plasma.

Tabla 2: Biosensores electroquímicos para la determinación de Fbg.

Transductor	Soporte	Tipo de inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	Ensayo	LD	Referencia
AuE	SAM	Co-deposición	Mb Hb CEA Fbg	OCP	---	---	Impronta molecular	---	[Yu, 2016 ^b]
SPCE	HOOC-MBs His Tag-MBs	Enlace covalente	Fbg	Amperometría ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2/HQ)	Muestra de plasma certificada	Estrep-HRP	Competitivo directo e indirecto	Ensayo indirecto: $0.044 \mu\text{g mL}^{-1}$	[Campuzano, 2014 ^a]
SPCE	CNH	Enlace covalente (EDC/NHSS)	Fbg	Amperometría ($E_{app} = -0.05$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2/HQ)	Plasma humano y orina	anti-Fbg-HRP	Competitivo indirecto	58 ng mL^{-1}	[Ojeda, 2014 ^b]
AuE	Matriz polimérica tridimensional de anilina, ácido sulfónico y AuNPs modificadas con biotina	Interacción por afinidad (Estrep-biotina)	Fbg	Amperometría ($E_{app} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl) (H_2O_2/HQ)	---	anti-Fbg-HRP	Competitivo indirecto	4 ng mL^{-1}	[Díez, 2014]
SPE	Inmovilización por adsorción	Fbg nitrado	SPCE	SWV	Suero y plasma humano	anti-nitrotirosina- HRP	Sándwich	0.9 pM	[Tang, 2010]

Abreviaturas utilizadas: **AuE:** electrodo de oro; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **CEA:** antígeno carcinoembrionario; **CNH:** Nanocuernos de carbono; **E_{app} :** potencial aplicado; **EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; **Estrep:** estreptavidina; **Fbg:** fibrinógeno; **Hb:** hemoglobina; **His-Tag:** cola de histidinas; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa de rábano; **LD:** límite de detección; **Mb:** mioglobina; **MBs:** partículas magnéticas; **NHSS:** N-hidroxisulfosuccinimida; **OCP:** potenciometría de circuito abierto; **SAM:** monocapas autoensambladas; **SPE:** electrodo serigrafiado; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada.

Campuzano y col. [Campuzano, 2014^a] compararon dos estrategias amperométricas basadas en SPCEs, HOOC-MBs e His-Tag-MBs empleando nanobodies (Nb) (fragmentos de anticuerpos con un único dominio que reconocen epítopos no accesibles a los anticuerpos convencionales) como elementos de captura y detección, sobre cada tipo de MBs, y conjugados de HRP como marcadores enzimáticos, mediante formatos competitivos de tipo indirecto y directo, para la determinación de Fbg en una muestra certificada de plasma, obteniendo las mejores características analíticas para el formato indirecto, donde el Fbg inmovilizado covalentemente en la superficie de las HOOC-MBs y el Fbg libre presente en la muestra compiten por los sitios de unión del Nb marcado con HRP. Aunque ambos formatos resultaron aplicables a la determinación de Fbg en la muestra seleccionada (con niveles comprendidos entre 1.5–4.5 mg mL⁻¹), debido a la mayor sensibilidad y el menor LD obtenido con el ensayo indirecto, éste se empleó para la determinación del contenido de Fbg por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en presencia del sistema H₂O₂/HQ para la muestra diluida 2500 veces en el calibrado obtenido para estándares de Fbg, debido a la ausencia de efecto matriz.

Por otro lado, Ojeda y col. [Ojeda, 2014^b] desarrollaron otro inmunosensor competitivo indirecto para Fbg inmovilizando covalentemente el Fbg sobre SPCEs modificados con nanocuernos de carbono (CNH) funcionalizados con grupos carboxílicos y realizando la competición entre el Fbg inmovilizado y el Fbg libre por los sitios de unión de un anticuerpo específico conjugado con HRP (anti-Fbg-HRP).

Esta estrategia, que proporcionaba mejor LD que la basada en el empleo de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) comerciales como soporte para la inmovilización de Fbg, se aplicó con éxito al análisis, sin efecto matriz, de una muestra de plasma humano con contenido certificado de Fbg y de muestras de orina contaminadas a distintos niveles.

Estas dos estrategias, desarrolladas en nuestro grupo de investigación, ejemplifican las importantes ventajas que aporta el empleo de MBs y materiales nanoestructurados de carbono para el desarrollo de biosensores electroquímicos con aplicaciones clínicas relevantes.

En el trabajo desarrollado por Tang y col. [Tang, 2010] compararon tres estrategias para la determinación de Fbg nitrado basadas en formatos tipo sándwich, a partir de la evaluación de distintas parejas de anticuerpos, y detectando por voltamperometría de onda

cuadrada (SWV) la señal de oxidación de la 2,3-diaminofenazina (DAP), generada en presencia de o-fenilenediamina (ODP), H_2O_2 y HRP. Aunque la estrategia más sensible resultó ser la que empleaba anticuerpos anti-Fbg como elementos de captura y anticuerpos específicos a los residuos nitrados de tirosina del Fbg marcados con HRP como elementos de detección, las tres estrategias desarrolladas demostraron su utilidad para la determinación de Fbg nitrado en muestras de suero y plasma humano suplementadas.

2.3.1.2. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE ENDOGLINA (CD105)

El crecimiento de las masas tumorales y su diseminación a otras partes del organismo depende de toda una cascada de mecanismos biológicos, como el proceso de angiogénesis (formación continuada de nuevos vasos sanguíneos) que está directamente relacionado con la propagación del tumor e invasión de otros órganos vitales (metástasis) [Rosen, 2014].

La endoglina (CD105) es una glicoproteína homodimérica transmembrana de 633 aminoácidos y un tamaño de 180 kDa formada por un dominio extracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana y un pequeño dominio intracelular. Existen dos isoformas de endoglina, la forma L y la forma S, que difieren en la longitud del dominio intracelular, la distribución tisular y el grado de fosforilación [Nassiri, 2011]. La **Figura 10** muestra la estructura molecular de la proteína CD105.

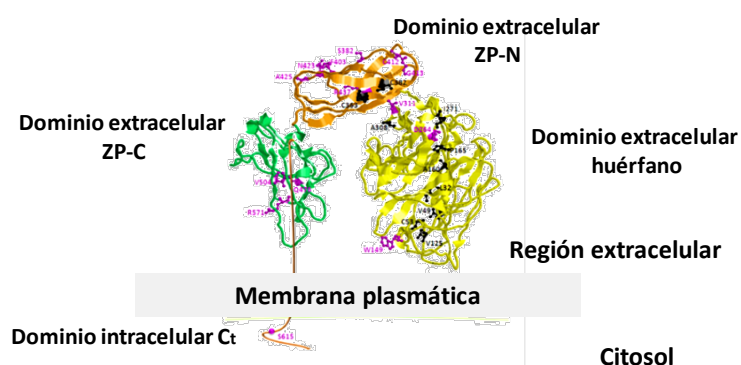


Figura 10: Estructura molecular de CD105 resaltando sus dominios principales.

La expresión de esta proteína es predominantemente endotelial y se considera un marcador específico de este tipo de células, presentando niveles elevados de expresión en zonas angiogénicas, regiones con daños vasculares, enfermedades autoinmunes y en el endotelio angiogénico de carcinomas y angiosarcomas [Díez, 2012]. La formación y

crecimiento de los vasos sanguíneos permite que los órganos se desarrollen correctamente, sin embargo, la alteración de estos procesos fomenta tanto el crecimiento de tumores como el desarrollo de metastásis. El aumento de los niveles de expresión de CD105 en regiones angiogénicas activas [Gómez, 2016], demuestra la correlación que existe entre este biomarcador y el desarrollo, crecimiento e invasión de ciertos tumores.

Además, CD105 es un importante modulador de las respuestas de diversas citoquinas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β), esenciales en el desarrollo embrionario y en el organismo adulto, e implicadas en diversos procesos patológicos [Díez, 2012] como mediadores de procesos de proliferación, migración y adhesión celular en células del endotelio [Dallas, 2008].

Los procesos de angiogénesis en el microambiente tumoral están fuertemente influenciados por diversos estímulos, siendo la hipoxia (falta o concentración de oxígeno significativamente baja en zonas concretas de la masa tumoral) uno de los más destacados. El papel de CD105 en este tipo de estímulos también resulta determinante ya que, aunque la expresión de esta proteína en tejido normal es baja o incluso nula, puede activarse en condiciones de hipoxia como consecuencia de la sobreexpresión del gen que la codifica. Nuevamente, diversas publicaciones ponen de manifiesto el importante rol de esta proteína como biomarcador de pronóstico, mostrando alteraciones significativas en sus niveles de expresión en estadios avanzados de carcinoma oral de células escamosas [Tadbir, 2014], cáncer colorrectal y de mama metastásicos (con niveles superiores a $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$ en muestras de plasma) [Labib, 2016], cáncer cerebral, particularmente glioblastomas, [Sugita, 2011] y en carcinoma de ovario derivado de células epiteliales [Xu, 2013], entre otros. El papel que desempeña esta proteína en cáncer se produce, principalmente, a dos niveles: como regulador de angiogénesis en las células del endotelio y como modulador del grado de malignidad en células tumorales. Debido a su estructura y disposición en la superficie de las células, ciertas metaloproteasas pueden liberar su dominio extracelular al torrente sanguíneo (Sol-Eng), encontrándose en muestras de suero, plasma y orina de mujeres diagnosticadas con preeclampsia (hipertensión inducida durante el proceso del embarazo que puede culminar con la muerte tanto de la madre como del feto), individuos con hipercolesterolemia, artritis reumatoide [Koch, 2000], epidermólisis bullosa [Hünefeld, 2013] y cáncer, particularmente de mama, próstata, colon y pulmón [Quintanilla, 2015]. Diversos estudios

han demostrado unos niveles de CD105 libre en circulación significativamente superiores al nivel de corte establecido (9.2 ng mL^{-1}) [Hasheesh, 2010] en muestras de suero de pacientes con carcinoma hepatocelular [Selim, 2014], [Mohamed, 2015] y cáncer de próstata [Fujita, 2009], [Karam, 2008], [Svatek, 2008].

Por tanto, teniendo en cuenta la relevancia de esta proteína en el desarrollo y evolución de diversas neoplasias y otras enfermedades relevantes, su determinación fiable en distintos tipos de muestras permite conocer más profundamente ciertos aspectos biomoleculares de la enfermedad y, por tanto, la aplicación de tratamientos más efectivos.

De manera convencional, la detección de CD105 se realiza mediante técnicas de inmunoensayo tipo ELISA, con características que, como se ha comentado, dificultan su implementación como dispositivos portátiles POC.

Tras una revisión bibliográfica, tan solo se han encontrado dos dispositivos electroquímicos para la determinación de este biomarcador, ambos basados en formatos integrados e inmunoensayos tipo sándwich. Uno de ellos emplea electrodos de oro modificados con AuNPs y SAMs para la inmovilización de anticuerpos anti-CD105. El proceso de detección se realiza empleando un conjugado de nanopartículas de platino (PtNPs), acetato de tionina y anticuerpos secundarios específicos a CD105, mediante voltamperometría cíclica (CV), obteniéndose una respuesta lineal comprendida entre $1.3\text{--}200 \text{ ng mL}^{-1}$ y un LD de 0.9 ng mL^{-1} , con una buena selectividad y estabilidad. Las principales limitaciones de este dispositivo residen en los tiempos de preparación del conjugado de detección y de modificación de la superficie electródica [Zeng, 2012]. El otro inmunoensayo, desarrollado muy recientemente, se basa en la inmovilización covalente del anticuerpo de captura sobre SPCEs modificados con el polímero ácido poli(pirrolepropiónico) por electropolimeración que genera una estructura porosa con gran cantidad de grupos --COOH [Martínez-Periñán, 2018]. Esta plataforma ha demostrado un intervalo lineal comprendido entre 0.18 y 20 ng mL^{-1} , un LD de 140 pg mL^{-1} y excelente aplicabilidad para la determinación de este biomarcador en muestras de suero de pacientes diagnosticados con epidermólisis bullosa y con distintos tipos de cáncer (mama, pulmón y colorrectal).

La existencia hasta la fecha de dos únicas plataformas biosensoras para la determinación electroquímica de este importante biomarcador, pone de manifiesto la necesidad de poner a punto nuevas estrategias biosensoras que mejoren las características analíticas obtenidas hasta el momento.

2.3.1.3. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE FGFR4

Los factores de crecimiento están formados por un grupo de proteínas de bajo peso molecular cuya función principal es controlar el crecimiento y la proliferación de las células mediante diversos procesos de señalización celular.

Los receptores tirosina quinasa (RTKs) comprenden un extenso grupo de receptores de señalización de la membrana celular compuestos por unas veinte familias proteicas, entre las que se encuentra la familia de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), compuesta por los receptores FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, con tres dominios extracelulares, un segmento de membrana y un dominio de tipo tirosina quinasa susceptible a la escisión [Gallo, 2015]. Al igual que ocurre con los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), las alteraciones en los mecanismos de señalización gobernados por los receptores FGFR están directamente relacionadas con procesos patológicos, como demuestra un estudio reciente en el que se analizaron una gran cantidad de tumores sólidos, encontrándose variaciones significativas en la expresión de FGFR en el 7.1 % de los casos y alteraciones observables en cada tipo de receptor. Los receptores FGFR resultan esenciales en la regulación de una infinidad de procesos relacionados con la reparación de tejidos, cicatrización y angiogénesis tumoral, tanto en las etapas embrionicas del desarrollo como en las etapas adultas, por lo que las alteraciones de su actividad normal pueden provocar rutas anómalas de señalización y la sobreexpresión de estas proteínas, característica común de una gran variedad de tipos de cáncer [Hallinan, 2016].

El receptor 4 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), con un tamaño de 120 kDa, se encuentra normalmente en la membrana plasmática, aunque puede complejarse con algunos de sus ligandos y realizar sus funciones directamente en el citosol o en el núcleo celular [Peláez-García, 2015].

La relación existente entre los niveles de expresión de FGFR4 y distintos tipos de cáncer se ha demostrado ampliamente a lo largo de los últimos años. En uno de los trabajos de Peláez-García y col. [Peláez-García, 2013] describieron la clara sobreexpresión de este receptor en líneas celulares de cáncer de colon en las etapas más avanzadas de la enfermedad. La gran relevancia de este receptor en procesos de tumorigénesis, invasión y supervivencia a este tipo de neoplasia, demostrada también en los estudios realizados por Barderas y col. [Barderas, 2012], requiere el desarrollo y la aplicación de terapias dirigidas hacia el mismo, como tratamiento alternativo para este tipo de enfermedad. Li y col. [Li, 2014^a] también encontraron una correlación significativa entre los niveles de FGFR4 y la mortalidad en pacientes con cáncer de colon, demostrando la utilidad de FGFR4 como biomarcador de pronóstico, cuyo silenciamiento se presenta como una estrategia terapéutica de gran interés en pacientes oncológicos en los estadios más avanzados de la enfermedad [Turkington, 2014].

Además de en cáncer de colon [Barderas, 2012],[Cho, 2017], [Ahmed, 2016] y cáncer gástrico [Li, 2016^a], [Inokuchi, 2017], [Chen, 2015], FGFR4 y la familia a la que pertenece (FGF) presentan alteraciones en sus niveles de expresión en cáncer de mama [Tenhagen, 2012], carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas [Ipenburg, 2016], cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, páncreas, y adenocarcinoma pituitario [Peláez-García, 2013].

Teniendo en cuenta que es una enfermedad prácticamente asintomática hasta encontrarse en etapas muy avanzadas, con el objetivo de reducir las tasas de mortalidad de un cáncer tan prevalente como el de colon, es esencial desarrollar e implementar programas de cribado que impliquen el análisis de todo tipo de biomarcadores moleculares [Pons, 2015].

Aunque CEA sigue siendo el único biomarcador de eficacia reconocida para la monitorización de pacientes con este tipo de cáncer, debido a su baja especificidad, incapacidad de diferenciar entre pólipos malignos y benignos, y fundamentalmente, debido a que el Grupo Europeo de Marcadores Tumorales, la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) no lo recomiendan para test de cribado [Lech, 2016], es de urgente necesidad el descubrimiento y la validación de nuevos biomarcadores específicos que discriminen entre individuos sanos y enfermos y permitan estratificar la enfermedad de manera precisa, sensible y selectiva.

Generalmente, la determinación de FGFR4 en células y tejidos se realiza mediante técnicas convencionales de IHC o Western Blot, que presentan importantes limitaciones para su implementación como métodos de análisis de rutina y proporcionan solo resultados semicuantitativos. En este sentido resulta destacable que hasta el comienzo de esta Tesis Doctoral no se había descrito ningún biosensor para la determinación de este receptor, lo que resultaría de gran interés para proporcionar importante información biológica relativa a los procesos mecanísticos celulares que tienen lugar en el entorno tumoral.

2.3.1.4. RELEVANCIA CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE HER-2

Otra familia de proteínas que forma parte del grupo de receptores tirosina quinasa son los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB), que han evolucionado en la especie *Homo sapiens* hasta contar con cuatro receptores y numerosos ligandos: ErbB1 (HER-1), ErbB2 (HER-2), ErbB3 (HER-3) y ErbB4 (HER-4) [Sánchez, 2010].

Los receptores de la familia ErbB/HER (**Figura 11**) regulan y median diversas rutas de señalización molecular, desde el exterior al interior de las células, involucradas en el desarrollo embrionario, desarrollo adulto, y proliferación, migración, diferenciación y reorganización estructural de las células, evidenciando su indudable importancia biológica [Carreón, 2012].

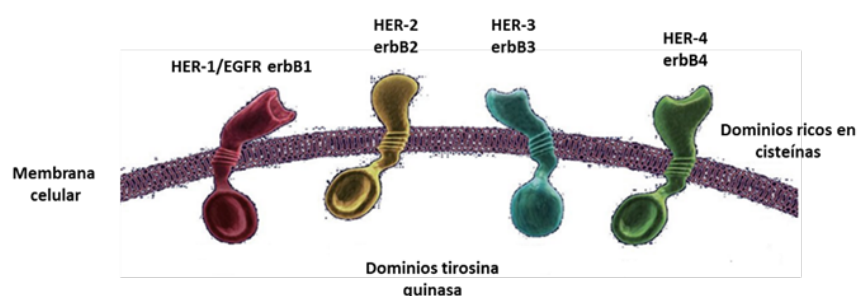


Figura 11: Principales receptores de la familia ErbB/HER.

El cáncer de mama, al igual que la mayoría de las neoplasias, es una enfermedad compleja y heterogénea, causada como consecuencia de numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas (expresión de proto-oncogenes y supresores tumorales, desestabilización cromosómica, alteración en los mecanismos de reparación genética y reactivación de la

telomerasa, etc.), que alteran los procesos celulares y promueven la adquisición de fenotipos malignos por parte de las células [Reis-Filho, 2008], [Rodenhiser, 2006].

Dada la heterogeneidad que caracteriza a esta enfermedad y la falta de fiabilidad de las metodologías empleadas para la clasificación de este tipo de neoplasias, se están realizando esfuerzos considerables para la identificación y validación de biomarcadores de pronóstico que permitan estratificar la enfermedad tanto desde el punto de vista biológico como histopatológico [Chan, 2013], y la toma de decisiones terapéuticas eficientes y personalizadas, adaptadas a las necesidades particulares de cada paciente [Dai, 2015].

Algunos biomarcadores de gran utilidad para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama, accesibles a través de “biopsias líquidas”, que permiten monitorizar el transcurso de la enfermedad de una forma más fiable y que se corresponde realmente con el estado actual de la neoplasia, incluyen CTCs, cfDNA [Du, 2013], y diversos tipos de biomarcadores característicos del tejido tumoral, como los receptores hormonales de estrógeno y progesterona (ER y PR), el HER-2, la proteína Ki67 y el plasminógeno activador de urokinasa y su inhibidor (uPA/PAI-1), entre otros. Recientemente, ASCO ha actualizado las recomendaciones para el uso de marcadores tumorales como biomoléculas de actuación en la prevención, cribado, tratamiento, seguimiento y supervisión del cáncer de mama, seleccionando para tal fin los biomarcadores: CA15-3, CA27.29, CEA, ER, PR, HER-2, uPA, PAI-1, p53, catepsina D, ciclina E y nestina, [Kabel, 2017] y de los que, por el momento, el análisis de ER, PR y HER-2, capaces de predecir los beneficios de terapias hormonales y anti-HER-2, respectivamente, es de carácter preceptivo y obligatorio en pacientes diagnosticadas con esta neoplasia.

Los estrógenos, de gran importancia durante el desarrollo de la glándula mamaria y tratamiento de cáncer de mama (ya que aproximadamente el 70 % de los cánceres de mama son ER α -positivos), enlazan y activan ER, que presenta dos isoformas principales ($-\alpha$ y $-\beta$) localizables tanto en la membrana como en el citoplasma celular, siendo la isoforma $-\alpha$ la que presenta validez clínica debido a su elevada expresión en pacientes con este tipo de neoplasia [Eletxigerra, 2016^a].

El PR pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares, y como su nombre indica, se encuentra principalmente en el núcleo celular [Cremoux, 2003]. La expresión de PR es altamente dependiente de la presencia de ER en el microambiente tumoral [Weigel, 2010] ya que controla la actividad de ER α , hecho de gran importancia en procesos asociados con el pronóstico e intervención terapéutica en relación a la evolución y tratamiento de este tipo de cáncer [Mohammed, 2015].

Así, ambos receptores hormonales se consideran biomarcadores predictivos y de pronóstico de gran relevancia cuyos niveles de expresión pueden predecir la respuesta de pacientes sometidas a tratamientos endocrinos, e informan acerca del pronóstico de la enfermedad [Duffy, 2017].

HER-2 (también conocido como HER-2/neu o c-erbB2) es el receptor con actividad tirosina quinasa más dominante en cáncer de mama, amplificado en, aproximadamente, el 20 % de los casos, y con elevados niveles de expresión también en neoplasia de ovario y de estómago.

Los subtipos de cáncer de mama que muestran amplificación del gen *HER-2* resultan más sensibles a la administración de fármacos anticancerígenos y presentan mayor resistencia a tratamientos basados en terapias hormonales [Plavetic, 2012].

Los protocolos convencionales que se emplean para el tratamiento de cáncer de mama dependen del estado de ER, PR y HER-2. Así, mientras que la presencia de estos receptores sugiere una mayor efectividad del tratamiento, la ausencia de éstos, característica del subtipo molecular de cáncer de mama TNBC, requiere tratamientos terapéuticos más tóxicos que los que se aplican en otros subtipos moleculares.

Desde el punto de vista molecular, y dependiendo de la expresión de ER, PR y HER-2, el cáncer de mama se clasifica en 4 subtipos moleculares [Hon, 2016], esquematizados en la **Figura 12**.

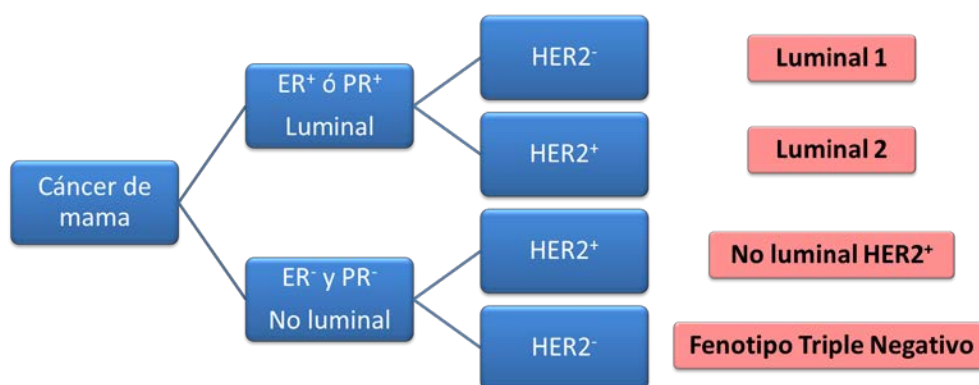


Figura 12: Clasificación de los principales subtipos moleculares de cáncer de mama dependiendo de la expresión de ER, PR y HER-2.

El gen *HER-2* también está implicado en el desarrollo de neoplasias epiteliales de colon, ovario, próstata, páncreas y pulmón, y amplificado en el 20–30 % de los carcinomas invasivos ductales, prediciendo un mal pronóstico clínico y cortas etapas de DFS y OS [Freudenberg, 2009].

Entre las metodologías para la detección de HER-2 a nivel proteico destaca la técnica IHC en muestras de tejido congelado, lo que limita la evaluación de HER-2 en la práctica diaria fuera de los entornos de los laboratorios de investigación [Niño, 2007]. Además, estudios recientes han demostrado que empleando estas metodologías, el 20 % de los pacientes calificados inicialmente como HER-2⁻ desarrollan con el tiempo un cáncer HER-2⁺ recurrente y que la determinación de la fracción soluble extracelular de este receptor (sHER-2) en suero, que puede desprenderse de la membrana celular y ser liberado a la circulación como consecuencia de diversas metaloproteasas, mejoraría significativamente la fiabilidad del diagnóstico y por tanto la eficiencia del tratamiento aplicado, estableciéndose para ello un valor de corte de 15 ng mL⁻¹ [Shi, 2017^a]. Asimismo, diversos estudios ponen de manifiesto la relación existente entre el nivel sérico de sHER-2, la carga tumoral, un peor pronóstico en cáncer de mama metastásico y la predicción de la respuesta del paciente frente a tratamientos de quimioterapia neoadyuvantes [Lee, 2016].

Como se ha comentado a lo largo de la introducción de esta Tesis Doctoral, la detección precoz de cualquier tipo de neoplasia resulta determinante en el pronóstico de la enfermedad y en la calidad de vida y supervivencia del paciente. Además de los métodos convencionales de análisis para biomarcadores de distinto nivel molecular relacionados con

el desarrollo del cáncer de mama, las exploraciones mamarias (o mamografías) están diseñadas con el fin de monitorizar mujeres sanas que en principio no presentan ningún síntoma asociado con el desarrollo de la neoplasia [Heywang-Köbrunner, 2011], así como para el diagnóstico de la enfermedad en casos sospechosos en los que se observa algún síntoma o signo específico de la misma. Las técnicas de exploración mamaria convencionales se basan en procedimientos de rayos X, con importantes desventajas asociadas a la limitada sensibilidad, al elevado riesgo de falsos positivos y a la exposición a radiaciones [Joy, 2005], lo que ha desencadenado un interés sustancial por parte de la comunidad internacional de oncología en la implementación de estrategias o metodologías alternativas para determinaciones rutinarias mínimamente invasivas para el diagnóstico de esta enfermedad.

En este sentido y, como consecuencia de las ventajas que ofrecen estos dispositivos electroquímicos, se han desarrollado hasta la fecha un gran número de estrategias biosensoras para la determinación electroquímica de biomarcadores asociados al cáncer de mama en todo tipo de muestras clínicas y especímenes biológicos [Campuzano, 2017^c]. Considerando la aplicación clínica real de tales dispositivos un requerimiento esencial para su futura implementación en la rutina hospitalaria, la **Tabla 3**, recoge algunos ejemplos de biosensores electroquímicos descritos para la determinación de HER-2 en los últimos 5 años.

Tabla 3: Biosensores electroquímicos para la determinación de HER-2.

Transductor	Soporte	Tipo de inmovilización	Ensayo	Marcador	Técnica de detección	LD	Muestra	Referencia
SPCE	ProtA-MBs	Interacción ProtA-región Fc del Ab	Sándwich	Estrep-AP	DPV (naftilfosfato)	6 ng mL ⁻¹	Suero humano	[Al-Khafaji, 2012]
GCE	Polipirrol-NHS@GCE	Enlace covalente entre las lisinas de Ab y NHS-polipirrol	Directo	---	EIS	100 células mL ⁻¹	Células	[Seven, 2013]
AuE	PEG @Fe ₃ O ₄ NPs	Enlace covalente entre Ab tiolado y los grupos de maleimida de las NPs	Directo	---	DPV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	0.995 pg mL ⁻¹	Suero humano	[Emami, 2014]
SPCE	HOOC-SPCE	Enlace covalente entre Nb y SPCE	Sándwich	Nb-HRP	Amperometría (E _{app} = -0.28 V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	1 µg mL ⁻¹	Lisados de células humanas suplementadas	[Patris, 2014]
SPCE	AuNPs@SPCE	Inmovilización del Ab por adsorción	Sándwich	Estrep-AP	ASLWV (3-IP/Ag ⁺)	4.4 ng mL ⁻¹	Suero humano suplementado	[Marques, 2014]
SPCE	AuNPs@SPCE	Inmovilización de Aff por quimisorción	Directo	---	EIS	6 ng mL ⁻¹	Suero humano	[Ravalli, 2015]
CILE	AuNPs@MWCNT-CILE	Enlace covalente entre Ab y AuNPs coloidales con grupos carboxílicos	Interacción Ag-Ab	---	EIS	7.4 ng mL ⁻¹	Suero humano	[Arkan, 2015]

Tabla 3 (continuación): Biosensores electroquímicos para la determinación de HER-2.

Transductor	Soporte	Tipo de inmovilización	Ensayo	Marcador	Técnica de detección	LD	Muestra	Referencia
Au-IDE	MPA@IDE	Enlace covalente entre aptámero HER-2 y MPA	Directo	---	nFIS	0.2 ng mL ⁻¹	Suero humano	[Qureshi, 2015]
SPCE	Estrep-MBs ProtA-MBs	Interacción por afinidad (Estrep-biotina) Afinidad ProtA-región Fc del anticuerpo	Sándwich	Estrep-AP	DPV (naftilfosfato)	Aff/Aff: 1.8 ng mL ⁻¹ Aff/Ab: 2.6 ng mL ⁻¹ Ab/Aff: 3.4 ng mL ⁻¹	Suero humano	[Ilkhani, 2016]
AuE	PEG@SAM@AuE	Coinmovilización aptámero-PEG@SAM@AuE vía alcanotiol	Directo	MB	CV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	10 ⁻¹² M	Suero humano	[Salimian, 2017]

Abreviaturas utilizadas: **Ab**: anticuerpo; **Aff**: affibody; **Ag–Ab**: complejo antígeno-anticuerpo; **ASLWV**: voltamperometría lineal con redisolución aniónica; **AP**: fosfatasa alcalina; **AuE**: electrodo de oro; **AuNPs**: nanopartículas de oro; **CILE**: electrodo de carbono de líquido iónico; **CV**: voltamperometría cíclica; **DPV**: voltamperometría diferencial de impulsos; **E_{app}**: potencial aplicado; **EIS**: espectroscopía de impedancia electroquímica; **Estrep**: estreptavidina; **Fc**: fragmento cristizable del anticuerpo; **GCE**: electrodo vitrificado de carbono; **HER-2**: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; **HQ**: hidroquinona; **HRP**: peroxidasa de rábano; **IDE**: microelectrodos interdigitados; **LD**: límite de detección; **MB**: azul de metileno; **MBs**: partículas magnéticas; **MPA**: ácido 3-mercaptopropiónico; **MWCNT**: nanotubos de carbono de pared múltiple; **Nb**: nanobody; **nFIS**: espectroscopía de impedancia no faradaica; **NHS**: N-hidroxisuccinimida; **PEG**: polietilenglicol; **ProtA**: proteína A; **SAM**: monocapa autoensamblada; **SPCE**: electrodos serigrafiados de carbono; **3-IP**: 3- indoxil fosfato.

Los trabajos desarrollados por Marques y col. y Emami y col., empleaban nanomateriales como modificadores electródicos para la inmovilización del Ab selectivo al dominio extracelular de HER-2 (HER-2 ECD), y su análisis en muestras de suero.

Marques et al. propusieron un inmunosensor electroquímico basado en una estrategia tipo sándwich en el que el conjunto HER-2 ECD-Ab detección (pre-incubado durante tan solo 5 minutos) era reconocido por un anticuerpo de captura previamente inmovilizado sobre un SPCE funcionalizado con AuNPs. La interacción Ag-Ab se monitorizaba por voltamperometría de barrido lineal (LSV), en presencia del conjugado Estrep-AP y 3-indoxil-fosfato (3-IP) e iones de plata, como marcador y sustrato enzimático, respectivamente, obteniendo un LD tres veces inferior al valor de corte establecido para HER-2 ECD en suero (15 ng mL^{-1}). La metodología se aplicó a la determinación directa de HER-2 en muestras de suero suplementadas con la diana molecular de interés [Marques, 2014].

El trabajo de Emami et al., se basaba en la modificación de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4 NPs) con polietilenglicol (PEG) y maleimida, para enlazar covalentemente anticuerpos anti-HER-2 tiolados. El conjunto Ab- Fe_3O_4 -NPs se inmovilizaba sobre electrodos de oro funcionalizados con AuNPs@MPA@Cys a partir de la interacción entre los grupos de maleimida libres y los grupos tiol de Cys. Tras el reconocimiento de HER-2 se monitorizaba la disminución de la señal de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), como consecuencia del mayor bloqueo de la superficie del transductor en presencia de elevadas concentraciones de HER-2, que dificulta la transferencia electrónica entre el electrodo y la disolución. El inmunosensor desarrollado se aplicó al análisis de HER-2 en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama en distintos estadios de la enfermedad validando los resultados obtenidos con la metodología ELISA [Emami, 2014].

Las excelentes propiedades que ofrecen las MBs también se han explotado para la detección de HER-2. Por ejemplo, Ilkhani et al., compararon tres inmunoensayos electroquímicos tipo sándwich, empleando como elementos de captura y detección anticuerpos y affibodies (elementos sintéticos que imitan las funciones de los anticuerpos), Estrep-MBs y ProtA-MBs, y SPCEs para realizar la transducción electroquímica mediante DPV. Los resultados presentados demostraron que el formato basado en el empleo de affibodies biotinilados como elementos de captura y detección, sobre Estrep-MBs, proporcionaba la mayor sensibilidad. La aplicación de este formato a la determinación de HER-2 en muestras

de suero suplementadas con el antígeno objetivo a distintos niveles de concentración [Ilkhani, 2016], confirmó la utilidad analítica de los affibodies, caracterizados por su pequeño tamaño, robustez y alta estabilidad, cuya estructura combina una hidrofobicidad bien definida y una región extendida con funciones de reconocimiento molecular, como bio-receptores prometedores en el diseño de inmunosensores electroquímicos [Justino, 2015].

Además de biosensores de afinidad basados en receptores proteicos para la determinación electroquímica de HER-2 en muestras de suero y células (tanto enteras como lisadas), también se encuentran en bibliografía diversos trabajos para la determinación de este biomarcador empleando aptámeros disponibles comercialmente y modificados con diversas terminaciones ($-SH$, $-NH_2$) para su correcta inmovilización sobre la superficie de transductores electroquímicos, monitorizando la extensión de la reacción de reconocimiento aptámero-proteína diana a través de las variaciones de la señal electroquímica de un indicador redox soluble, donde la transferencia electrónica puede ser acelerada, retardada o impedida, dependiendo del proceso de reconocimiento que tiene lugar.

Recientemente, Salimian y col. [Salimian, 2017] han desarrollado un biosensor electrocatalítico con una sensibilidad del orden de pM para el análisis de HER-2 inmovilizando aptámeros tiolados sobre transductores de oro previamente modificados con monocapas autoensambladas de polietilenglicol (PEG@SAM@AuE), empleando azul de metileno (MB) como indicador redox y CV. La aplicabilidad exitosa de esta metodología al análisis de muestras de suero al 1 % se atribuye tanto a la minimización de las posibles adsorciones inespecíficas por parte de PEG@SAM como a la amplificación de la señal del MB, que cataliza la reducción del par redox empleado $Fe(CN)_6^{3-/4-}$.

Como se muestra en la **Tabla 3**, existen una gran variedad de estrategias electroquímicas para la determinación de HER-2 basadas en todo tipo de técnicas de detección y superficies transductoras modificadas con materiales de escala micro- y nanométrica y/o monocapas autoensambladas, que favorecen tanto la minimización de las adsorciones inespecíficas como la inmovilización y orientación de los elementos de reconocimiento, que comprenden desde anticuerpos convencionales a biomoléculas proteicas más novedosas, tanto naturales (nanobodies) como sintéticas (affibodies), y secuencias sintéticas de oligonucleótidos (aptámeros). Estos antecedentes demuestran una vez más, la enorme versatilidad que ofrecen los biosensores electroquímicos para el

desarrollo de estrategias analíticas sencillas, con una sensibilidad y selectividad apropiadas para la detección de pequeñas variaciones en la expresión de biomarcadores proteicos en muestras de elevada complejidad (tejidos, células enteras y lisadas, y suero), y cuyo nivel de corte establecido para discriminar entre pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y mujeres sanas, que se encuentra en un nivel de ng mL^{-1} , es perfectamente detectable mediante estas herramientas biosensoras empleando protocolos sencillos y rápidos.

2.3.1.5. DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS FRENTE A p53

El mecanismo de defensa humano está integrado por dos partes principales: la respuesta humoral inmune y la respuesta inmunológica mediada por células que participan de manera activa en la respuesta de nuestro cuerpo frente a la aparición y desarrollo de cáncer [Chen, 1997] y otros desórdenes autoinmunes.

Por su descontrolada división y crecimiento, las células cancerígenas pueden formar masas tumorales que invaden zonas circundantes del cuerpo susceptibles de ser atacadas por el sistema inmunitario. Durante la tumorigénesis las células cancerígenas sufren un proceso de remodelación que provoca variaciones en los perfiles de expresión de diversas proteínas y en el microambiente tumoral general, acompañado de la secreción de biomoléculas, normalmente de naturaleza proteica, que junto con microvesículas y otras entidades intracelulares liberadas por células tumorales muertas, pueden ser reconocidas por nuestro sistema de defensa como agentes externos y desencadenar una respuesta inmune. Estos procesos demuestran la relación que existe entre el sistema inmune de cada individuo y la presencia de células cancerosas o pre-cancerosas [Heo, 2012].

Durante los procesos de transformación maligna, la mayoría de los autoantígenos proteicos de los que disponemos, que pueden clasificarse en tres grandes grupos, presentan un funcionamiento anormal, siendo algunos de ellos específicos del tumor:

- 1) Antígenos virales, expresados en tumores asociados, capaces de provocar respuestas inmunes dependientes de células T
- 2) Antígenos resultantes de mutaciones genéticas, que producen un incremento en la inmunogenicidad, y ofrecen nuevos epítomos antigénicos a través de mutaciones puntuales, entre otras causas

3) Antígenos expresados únicamente en distintos tipos histológicos de tumores

Diversos tipos de cáncer, tanto en sus etapas tempranas como en las más avanzadas, se caracterizan por presentar AAs asociados a TAAs cuyo mecanismo de producción (**Figura 13**) se cree debido al incremento de la inmunogenicidad de dichos TAAs como consecuencia de posibles mutaciones y/o alteraciones en sus niveles normales de expresión [Macdonald, 2017].

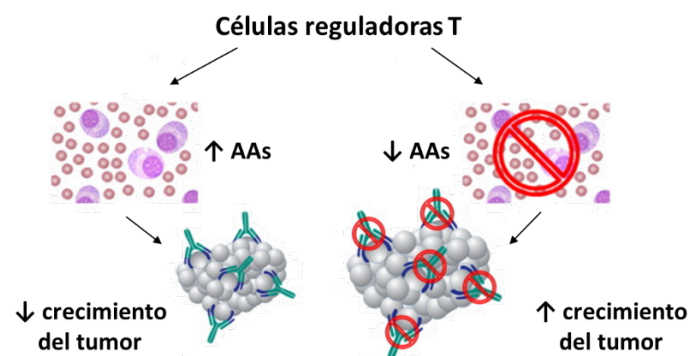


Figura 13: Producción de AAs por las células T y relación con el crecimiento de la masa tumoral.

El sistema inmune produce distintos tipos de anticuerpos que reaccionan específicamente frente a un antígeno en particular. Todos los individuos sanos presentan inmunoglobulinas específicas hacia antígenos propios presentes en el organismo de forma natural (autoantígenos), denominados autoanticuerpos naturales, que son IgMs que constituyen nuestra primera línea de defensa contra posibles infecciones y con afinidad moderada frente al antígeno diana. Por el contrario, cuando tiene lugar algún proceso de mutación biológica en nuestro cuerpo, las inmunoglobulinas producidas por nuestro sistema de defensa son generalmente IgGs, conocidas como autoanticuerpos y caracterizadas por su elevada afinidad hacia el antígeno específico y por ser los principales indicadores de que algún proceso patológico está teniendo lugar en nuestro organismo [Elkon, 2008].

Muchas proteínas, que tienen una función principal en mecanismos biológicos de los que depende el correcto funcionamiento del ciclo celular (regulación, reparación y replicación del DNA y procesamiento de RNA, entre otros), también sufren algún tipo de alteración en sus niveles de expresión durante el desarrollo del cáncer, por lo que se les conoce como TAAs, desencadenan la producción de AAs específicos, y se consideran biomarcadores específicos

de la enfermedad neoplásica. En este sentido, nuestro sistema inmune puede entenderse como un potente biosensor capaz de detectar mínimas alteraciones en los niveles normales de TAAs y, por tanto, de gran utilidad para discriminar entre estados cancerosos y estados normales mediante ensayos serológicos que determinen la presencia de AAs específicos [Dudas, 2010].

Teniendo en cuenta que los biomarcadores se caracterizan por ser moléculas dinámicas, es decir, cuyo contenido puede variar en el tiempo en función del estado fisiológico del organismo, y que las inmunoglobulinas destacan, a diferencia de los marcadores proteicos y genéticos, por su elevada estabilidad en suero pudiendo persistir en este medio durante largos periodos de tiempo incluso una vez que el factor antigénico ha desaparecido [Chatterjee, 2006], los AAs se consideran en la actualidad biomarcadores prometedores con enormes posibilidades clínicas para diagnóstico temprano y mínimamente invasivo en muestras como suero, saliva, plasma y orina. Algunas de las propiedades intrínsecas de los AAs por los que son considerados excelentes biomarcadores para la detección precoz de cáncer son:

- Posibilidad de ser detectados hasta 5 años antes de la manifestación de los primeros síntomas de la enfermedad.
- Su posibilidad de detección en muestras de fácil accesibilidad permite la práctica de ensayos de cribado en pacientes.
- Elevada estabilidad y larga vida media en suero (7 días), minimizando fluctuaciones significativas en el tiempo asociadas a la toma de muestra.
- Se encuentran en concentraciones significativamente superiores a la de su TAA específico, debido a la amplificación por el sistema inmune.

Las limitaciones que presentan en sensibilidad y especificidad los procesos de cribado y diagnóstico de cáncer basados en la determinación de este tipo de biomarcadores, atribuidos al hecho de que los individuos desarrollen anticuerpos frente a una gran variedad de TAAs y a la heterogeneidad en el nivel de producción de AAs dependiendo del individuo, puede solventarse mediante la detección simultánea de paneles específicos de AAs identificados frente a distintos TAAs para el tipo/estado de la neoplasia en estudio [Tan, 2009].

La relevancia clínica de estos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico se ha demostrado en numerosas publicaciones. Además de la gran estabilidad de estas biomoléculas circulantes como respuesta a mutaciones, alteraciones estructurales o cambios en la expresión de diversos antígenos tumorales [Järås, 2011], el hecho de que nuestro organismo responda a este tipo de estímulos desencadenando una respuesta inmune amplificada en la que se producen una gran cantidad de AAs específicos a TAAs, implica que una pequeña cantidad de antígeno es suficiente para la producción de una gran concentración de anticuerpos y por tanto, su gran relevancia tanto para seguimiento como para diagnóstico temprano de procesos cancerígenos [Hanash, 2003].

Con el objetivo de demostrar la utilidad diagnóstica de estos biomarcadores, Nesterova y col. [Nesterova, 2006] llevaron a cabo un novedoso inmunoensayo enzimático para la determinación de autoanticuerpos IgG específicos a la proteína extracelular quinasa A (ECPKA), demostrando que individuos diagnosticados con distintos tipos de cáncer (riñón, mama, cervical, colon, esófago, estómago, hígado, ovario, páncreas, próstata, melanoma, sarcoma y liposarcoma) presentaban un aumento en los niveles de expresión de estas IgGs en distintas etapas de la neoplasia y en diferentes tipos celulares. Estos resultados ponen de manifiesto las útiles capacidades diagnósticas y pronósticas de los AAs, detectables en todo tipo de neoplasias, en muestras mínimamente invasivas y en cualquier fase de la enfermedad, especialmente en las etapas más tempranas donde todavía no resulta detectable por las metodologías convencionales.

Contrariamente a otros tipos de biomarcadores, cuya detección convencional se basa en técnicas de imagen altamente sensibles y específicas pero incapaces de discriminar entre procesos benignos y malignos, o en biopsias sólidas de carácter invasivo con numerosas limitaciones prácticas que, generalmente, solo arrojan información del tumor primario, los AAs pueden detectarse mediante metodologías económicas y sencillas, que proporcionan resultados del estado de la enfermedad en tiempo real complementando a los revelados por otros biomarcadores y posibilitando tanto un diagnóstico más fiable como temprano de la enfermedad [Macdonald, 2017].

Una de las anormalidades genéticas más observadas en la mitad de los tumores sólidos es la mutación del gen supresor tumoral p53 (*TP53*). Este gen, que codifica para la fosfoproteína p53, conocido como “el guardián del genoma” y cuya función principal es proteger a las células de procesos de carcinogénesis, desempeña un papel fundamental en los procesos de transformación maligna de las células sanas [Suppiah, 2013]. Cuando se produce alguna mutación en *TP53*, la proteína p53 no funcional (o mutada), se hiperproduce y se comporta como un antígeno “extraño” a nuestro sistema inmune, activando la producción masiva de AAs específicos (p53-AAs) en tejidos, células amorfas y diversos fluidos biológicos [Zhang, 2014^a].

Aunque se pueden encontrar AAs específicos frente a diversos TAA, como NY-ESO-1 en cáncer de próstata [Fosså, 2004], GLEA2 y PHF3 en glioblastoma [Pallasch, 2005], MUC1 [Hamanaka, 2003] y ENOA 1, 2 [Tomaino, 2011] en cáncer de páncreas, CEA en cáncer de colon [Albanopoulos, 2000] y mama [Haidopoulos, 2000], y AZGP1 en adenocarcinoma de pulmón [Albertus, 2008], los AAs específicos a p53 son los más ampliamente estudiados como biomarcadores séricos precoces para diagnóstico y pronóstico en cáncer de ovario [Anderson, 2010], [Anderson, 2015], estómago [Werner, 2015], mama [Müller, 2006], [Soussi, 2000], colon [Iwamuro, 2015], [Negm, 2016], y esófago [Zhang, 2012^b]. De hecho, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos séricos frente a p53 en el 10–40 % de los pacientes diagnosticados con cáncer [Pedersen, 2013], [Soussi, 2000], [Katchman, 2016].

Nuevamente, las técnicas inmunológicas enzimáticas como ELISA, inmunoblotting, y microarrays de proteínas, de difícil implementación clínica, son las metodologías más empleadas para la determinación de AAs, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias sencillas, asequibles económicamente, sensibles, de rápida respuesta y con capacidades de multiplexado, como los biosensores electroquímicos, representa una interesante vía de aplicación de estos dispositivos para la monitorización precisa de AAs en muestras de suero y otros fluidos biológicos de pacientes oncológicos.

La mayoría de los dispositivos de biosensado reportados hasta el momento para la detección de AAs se basan en técnicas de detección ópticas o piezoeléctricas, que monitorizan las variaciones de las frecuencias de oscilación [Schlichtiger, 2012] o de la tensión superficial [Zhou, 2009] sobre la superficie transductora.

Algunos trabajos publicados describen el desarrollo de biosensores electroquímicos para la detección de AAs frente al glicopéptido CSF114 en pacientes con esclerosis múltiple [Real-Fernández, 2008] y de anticuerpos específicos a gliadina en individuos con trastornos celíacos [Ortiz, 2011], encontrándose tan solo tres estrategias biosensoras para la determinación electroquímica de p53-AAs.

Prats-Alfonso y col., desarrollaron un biosensor impedimétrico basado en la formación de SAMs de péptidos específicos sobre soportes de oro para la detección directa de p53-AAs en muestras de suero sin diluir, proporcionando un LD de 0.01 pg mL^{-1} . Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de detectar, en 2 horas, concentraciones de p53-AAs tan bajas como 10^{-17} M en PBS y de 10^{-12} M en suero humano sin diluir [Prats-Alfonso, 2012].

En otro trabajo publicado recientemente, los autores desarrollaron un biosensor basado en el ensamblaje de AuNPs sobre óxido de grafeno reducido electroquímicamente (ERGO) y funcionalizado con grupos tiol, previamente inmovilizado sobre la superficie de SPCEs mediante “electrografting”. El nanomaterial obtenido (AuNP/ERGO), que combina las excelentes propiedades intrínsecas de las AuNPs y los nanomateriales derivados del grafeno, proporciona un aumento en el área superficial que permite la inmovilización efectiva de p53 mediante interacciones electrostáticas entre los grupos amino de la proteína y las AuNPs. El reconocimiento entre p53-AAs y el antígeno p53 inmovilizado sobre SPCEs se monitoriza mediante SWV en presencia de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, obteniéndose una disminución de la señal con el incremento de concentración de AAs como consecuencia del bloqueo de la superficie transductora. En las condiciones experimentales óptimas, los autores obtuvieron un LD de 0.088 pg mL^{-1} , un amplio intervalo lineal (0.1 pg mL^{-1} – 100 ng mL^{-1}) y una buena selectividad frente a otros AAs (EGFR-AAs y PDGFR α -AAs). La aplicabilidad real de esta bioplataforma se confirmó realizando estudios de recuperación en muestras de suero humano suplementadas con distintos niveles de p53-AAs [Elshafey, 2016].

Más recientemente, se ha desarrollado otro método electroquímico para la detección temprana de p53-AAs en cáncer de colon mediante la combinación de nanocubos porosos de óxido de hierro (Fe_2O_3) con propiedades magnéticas funcionalizados con oro, modificando su superficie con p53 mediante adsorción directa sobre la superficie de oro. Tras la captura específica de los AAs presentes en las muestras de suero analizadas, se añaden al sistema anticuerpos secundarios marcados con HRP que catalizan la oxidación enzimática del sistema

TMB/H₂O₂ sobre electrodos serigrafados de oro (SPAUE) monitorizada mediante cronoamperometría a 0.15 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Esta metodología demostró un LD de 0.02 U mL⁻¹, un rango lineal comprendido entre 0.02 y 14 U mL⁻¹ y aplicabilidad práctica en el análisis de muestras de suero de pacientes diagnosticados con cáncer de colon en diferentes estadios. Las excelentes prestaciones analíticas que ofrece esta plataforma biosensora se atribuyen tanto a la presencia de AuNPs en la superficie porosa de Fe₂O₃, que permite la adsorción de una gran cantidad de p53, como a la naturaleza magnética de las nanopartículas empleadas, que incrementan la sensibilidad del ensayo gracias a la eficiencia de los procesos de reconocimiento, separación y purificación llevados a cabo en su superficie [Yadav, 2017].

El hecho de que no existan muchos dispositivos de análisis para la determinación de este tipo de inmuno-biomarcadores, especialmente aquellos asociados con el desarrollo de neoplasias, supone el escenario perfecto para trasladar las excelentes capacidades que presentan los biosensores electroquímicos para la detección de este tipo de dianas moleculares de gran relevancia en diagnóstico temprano y seguimiento de cáncer y otras enfermedades de gran impacto como las autoinmunes. El desarrollo de plataformas electroquímicas de análisis miniaturizables y acoplables a sistemas de multiplexado o multidetección de analito, que permitan la detección fiable, selectiva y sensible de paneles de autoanticuerpos contra un amplio espectro de antígenos asociados a tumores supondrá un importante avance en los campos de ciencia médica y oncología clínica. La implementación de estos paneles multianalito como dispositivos POCT que discriminen y categoricen subtipos moleculares de cáncer en cualquier estadio y de una forma mínimamente invasiva mediante “inmunofirmas” específicas a escenarios oncológicos particulares, resultaría de tremendo interés tanto para mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes oncológicos como para aliviar la carga financiera impuesta a sistemas nacionales de la salud.

2.3.2. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES GENÉTICOS

Uno de los hitos históricos que cambiaron el mundo y revolucionaron la comunidad científica es el descubrimiento de la estructura de la molécula de DNA, hace más de 60 años, gracias a las aportaciones de Maurice Wilkins y la química y cristalógrafa inglesa, Rosalind Franklin.

El DNA es un polímero lineal no ramificado formado por la repetición sucesiva de nucleótidos que se enlazan generando cadenas compuestas por cientos, miles o millones de unidades. Los componentes básicos de los nucleótidos son: una molécula de azúcar (2'-desoxirribosa), una base nitrogenada de tipo púrica (adenina, A o guanina, G) o pirimidínica (citocina, C o timina, T), y un grupo fosfato enlazado al carbono en posición 5' de la molécula de azúcar. Aunque las células pueden contener nucleótidos con uno, dos o tres grupos fosfatos, solo los que presentan tres actúan como sustratos para la síntesis del DNA [Brown, 2002]. La estructura del DNA está compuesta por dos cadenas polinucleótidas enrolladas entre sí formando una doble hélice, donde la columna vertebral de cada una de las hélices está compuesta por residuos de azúcar (2'-desoxirribosa) y de fosfatos. Los nucleósidos (base nitrogenada-azúcar) se unen entre sí mediante enlaces glicosídicos y fosfoéster para formar los nucleótidos (nucleósido-grupo fosfato), unidad estructural de construcción fundamental del DNA. Al contrario de lo que ocurre en esta espina dorsal, el orden de sucesión de bases nucleotídicas en el DNA es irregular, y precisamente esta irregularidad comprende la base fundamental del contenido de información que presenta esta biomolécula [Watson, 2004].

Asumiendo que las bases nitrogenadas se encuentran en su forma tautomérica más plausible, solo pueden unir bases de cada cadena polinucleotídica de manera específica: A con T, y G con C, de manera que la secuencia de bases complementarias a una cadena puede determinarse inequívocamente mediante la complementariedad existente entre las bases [Watson, 1953].

En la **Figura 14** se representan las estructuras y las bases nitrogenadas que conforman las moléculas de RNA y DNA.

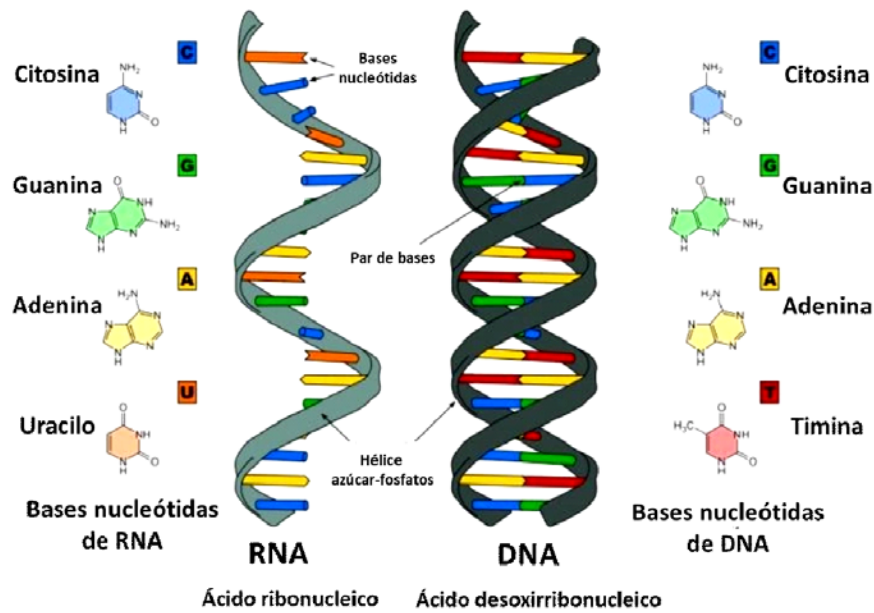


Figura 14: Estructura general y composición de las bases nitrogenadas que conforman las moléculas de RNA y DNA.

Al contrario que el DNA, el RNA es una molécula lineal formada por un esqueleto de azúcar (ribosa) y fosfato, y cuatro bases nitrogenadas distinguibles entre sí que también interaccionan mediante enlaces de hidrógeno como consecuencia de la complementariedad de bases: guanina-citosina (G-C) y adenina-uracilo (A-U). Sin embargo, en el RNA las bases no se emparejan para formar estructuras de doble hélice, sino que los nucleótidos presentan total libertad para interaccionar entre sí dentro de cada molécula, originando estructuras secundarias [Ramos, 2014].

Aunque el protagonismo y la importancia de este polímero han estado eclipsados durante muchos años por las funciones y propiedades del DNA, y de las proteínas en general, la evolución histórica del RNA es tal que se le considera una de las fuerzas principales que guían el progreso de la evolución [Lehman, 2010].

Así, aunque el DNA almacena la información requerida para la síntesis de proteínas, y el RNA ejecuta las instrucciones codificadas por el DNA, la mayoría de las actividades biológicas que tienen lugar en el confinamiento celular son llevadas a cabo por las proteínas, de modo que la síntesis precisa de éstas es crucial para el correcto funcionamiento de células y, por tanto, de los organismos. El rol biológico que desempeña el RNA viene determinado por la actuación específica de tres tipos de RNAs: el RNA mensajero (mRNA), que transporta la información genética almacenada por el DNA, el RNA de transferencia (tRNA), que descifra

y transfiere los códigos transportados por el mRNA, y el RNA ribosómico (rRNA), que cataliza el ensamblado de los aminoácidos en forma de proteínas. En este proceso global, que se conoce como proceso de traducción de la información genética, la función principal de la molécula de RNA se considera la clave molecular del origen de la vida [Lodish, 2000].

RNAs NO CODIFICANTES

Además de los que intervienen en la síntesis proteica, existen otros tipos de RNAs con funciones biológicas determinantes a todos los niveles moleculares, conocidos como RNAs no codificantes (ncRNAs) [Wang, 2017^a] que han originado un gran interés teniendo en cuenta su implicación en todo tipo de enfermedades, y cuya desregulación resulta de gran relevancia en procesos tumorigénicos y en el desarrollo de enfermedades degenerativas y cardiovasculares [Esteller, 2011].

Dentro de los ncRNAs, los más estudiados son los miRNAs, RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), y RNAs asociados a piwi (pi-RNAs), debido a sus papeles reguladores en el genoma humano, a su relación con numerosas disfunciones y patologías a nivel celular y a su participación en el desarrollo de distintos tipos de cáncer [Choudhuri, 2010]. Una de las diferencias que presentan ambas variantes ribonucleicas reside en sus mecanismos de actuación celular, basado en el reconocimiento de moléculas de mRNA. Mientras que los siRNAs presentan una complementariedad de bases perfecta o casi perfecta, los miRNAs muestran un emparejamiento imperfecto con su mRNA diana, lo que desencadena la represión de la traducción proteica del mRNA o incluso su degradación [Großhans, 2008].

BIOGÉNESIS DE MiRNAs Y ROL EN CÁNCER

Los miRNAs, originariamente descubiertos en el nematodo *Caenorhabditis Elegans*, están presentes en todos los eucariotas y suponen entre el 1 y el 5 % del genoma, desempeñando funciones reguladoras en al menos el 30 % de los genes codificantes de proteínas [Rajewsky, 2006], [Liu, 2007], [Stanczyk, 2008]. Estas moléculas endógenas y altamente conservadas, que presentan un tamaño comprendido entre 20–24 nts, desempeñan importantes funciones en el desarrollo de cáncer, abarcando procesos de proliferación celular, control del ciclo celular, apoptosis o suicidio celular y procesos de diferenciación y migración [Jansson, 2012], entre otros.

La biosíntesis de estos pequeños reguladores (**Figura 15**) comienza en el núcleo celular a partir de la transcripción del gen codificante de miRNA mediada por la RNA polimerasa II para formar transcritos primarios (pri-miRNAs) de un gran número de bases (500–3000 nts) con estructura característica de tipo horquilla, que son reconocidos por la enzima nuclear Drosha y su cofactor DGCR8 [Reddy, 2015], [Huang, 2011], y transformados en una estructura tipo horquilla de 70–80 nts conocida como miRNA precursor (o pre-miRNA) [Du, 2005], [Denli, 2004], [Lee, 2003]. Todavía en el núcleo, el pre-miRNA es transportado al citoplasma por la enzima Exportina 5 donde la enzima Dicer lo corta formando un híbrido de miRNA/miRNA* de aproximadamente 22 nts que se asocia con proteínas de la familia de las Argonautas (Ago), formando el complejo de inducción de silenciamiento del RNA (RISC) [Hata, 2015], en el que el miRNA maduro reconoce e hibrida con 7 nts de su mRNA diana y cuya especificidad de enlace acelera el proceso de degradación del mRNA o la reducción de su traducción a proteínas [Bartel, 2009], [Djuranovic, 2011], dependiendo del nivel de complementariedad existente entre el miRNA maduro y su mRNA diana. El hecho de que el sitio de unión del miRNA a su mRNA comprenda un número tan pequeño de bases hace que existan múltiples mRNA dianas para cada miRNA [Hayes, 2014].

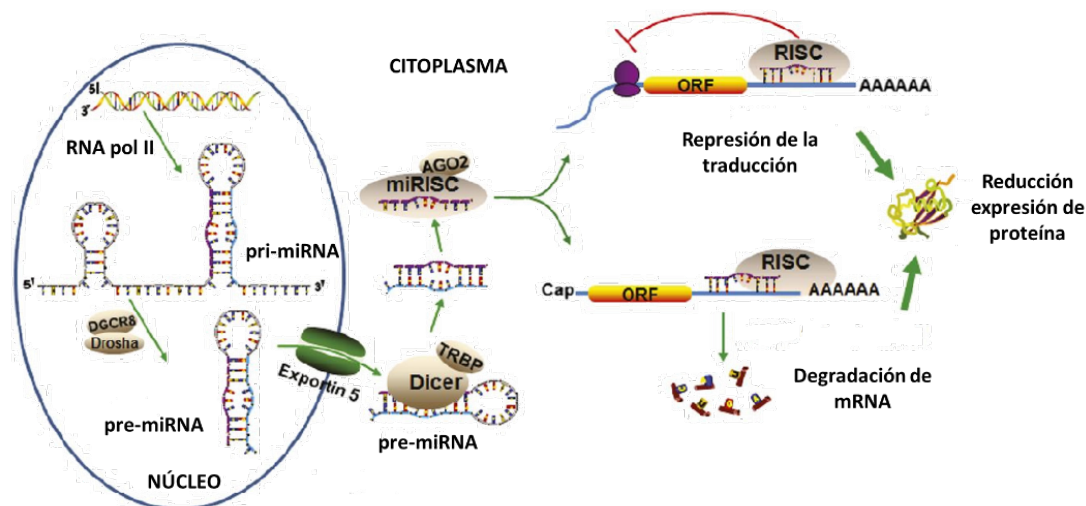


Figura 15: Etapas principales del mecanismo de biogénesis de miRNAs.

Los perfiles de expresión de miRNAs, que se encuentran alterados en tumores específicos, proporcionan una vasta información acerca de su función y regulación en el desarrollo de cáncer y otras enfermedades [Mayr, 2007], [Garzon, 2006], [Nelson, 2008], [Wang, 2008^b], [Hansen, 2007], demostrando su gran relevancia y utilidad desde el punto de

vista de diagnóstico, progreso y evaluación de la efectividad de los tratamientos aplicados durante la enfermedad [Hernando, 2007], [Barbarotto, 2008].

Los procesos de proliferación celular descontrolada, que favorecen y aceleran la formación de tumores y el desarrollo de cáncer, son regulados por numerosos factores que activan o desactivan genes oncogénicos y supresores de tumores, respectivamente, lo que puede desembocar en la acumulación de una serie de factores que culminan en el desarrollo de tumores. Dependiendo de la manera en la que controlen o regulen la expresión génica en eucariotas, los miRNAs desempeñan dos papeles fundamentales en cáncer: como supresores de tumores o como oncogenes [Esquela-Kerscher, 2006].

La amplificación o hiperexpresión de los miRNAs puede disminuir la regulación de genes supresores tumorales u otros genes involucrados en la diferenciación celular, contribuyendo al desarrollo de tumores y actuando por tanto como oncogenes, y de igual forma, algunos miRNAs pueden disminuir la regulación de proteínas con actividad oncogénica, adoptando en este caso un rol de supresores tumorales [Shenouda, 2009].

Una de las primeras indicaciones que demuestran que la desregulación de miRNAs es fundamental en el desarrollo de neoplasias son las obtenidas por Croce y Kumar, en cuyos trabajos demostraron que aproximadamente el 50 % de los miRNAs humanos se encuentran en regiones genómicas asociadas al cáncer (CAGRs), como sitios frágiles cromosómicos, regiones mínimas de pérdida de heterozigosidad, regiones mínimas de amplificación o regiones de punto de ruptura comunes, y que la represión de los procesos de maduración de los miRNAs promueve la transformación celular y los procesos de tumorigénesis. Además, como demuestran numerosos estudios, los perfiles de expresión de los miRNAs son perfectamente distinguibles en tejidos tumorales y normales, lo que evidencia la funcionalidad de estos reguladores como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en cáncer [Costa, 2013].

Cuando los miRNAs supresores tumorales sufren una disminución en su expresión normal como consecuencia de defectos en algunas de las etapas de su bioproducción, mutaciones, alteraciones epigenéticas u otras irregularidades, se produce un incremento descontrolado de proteínas oncogénicas que favorecen la formación de tumores, mientras que cuando un miRNA oncogénico se encuentra sobreexpresado debido a una amplificación en los genes que los transcriben, o a la activación de promotores involucrados en la biogénesis

de dicho oncomiRNA, los genes supresores de tumores se silencian, favoreciendo también el desarrollo de tumores [Parasramka, 2012], [Kong, 2012].

El miRNA-21 es uno de los miRNAs oncogénicos más relevantes. Este oncomiR, de alto número de copias, se encuentra hipereexpresado de manera significativa en cáncer de mama y está asociado con las etapas más avanzadas de la enfermedad, procesos metastásicos y pronósticos desalentadores [Si, 2013]. Se sabe que la reducción de la expresión de miRNA-21 podría contribuir a la ralentización del proceso cancerígeno [Asaga, 2011]. Además de en cáncer de mama, el miRNA-21 se encuentra hipereexpresado en cáncer de ovario, pulmón y de colon, lo que indica su importante, a la vez que poco específico, valor diagnóstico y pronóstico [Wang, 2015^a], [Ren, 2017], [Rasti, 2016], [Peng, 2017]. El miRNA-155 (cuya expresión influye en la supervivencia celular del tumor y la quimiosensibilidad) [Kong, 2010], el miRNA-27a [Tang, 2012], el miRNA-9 (que contribuye a la angiogénesis y al desarrollo de cáncer) y el miRNA-10b (cuyo nivel de expresión está correlacionado con el grado patológico, estadio clínico y metástasis del nódulo linfático) [Liu, 2012], son algunos ejemplos de otros miRNAs con funciones oncogénicas demostradas en la neoplasia mamaria.

Una pequeña muestra de miRNAs supresores de tumores incluye el miRNA-145 (que regula negativamente al gen *ERα* mediando el crecimiento de las células cancerígenas mamarias) [Spizzo, 2010], diversos miRNAs pertenecientes a la familia de miRNA-200 [Li, 2014^b] y de let-7 [Thammaiah, 2016], y el miRNA-205, específico de cáncer de mama e involucrado en angiogénesis [Markou, 2014] y con bajos niveles de expresión en cáncer de mama, de próstata y de riñón, entre otros [Hezova, 2016].

Sin embargo, también existen miRNAs que pueden desempeñar ambos roles dependiendo de la neoplasia, como el miRNA-125b que se encuentra hipoexpresado en cáncer de ovario, tiroides, mama y carcinoma oral de células escamosas [Nam, 2008], [Visone, 2007], e hipereexpresado en cáncer de próstata [Le, 2009], [Ozen, 2008]. Esta dualidad funcional también es característica del miRNA-205, que se comporta como supresor tumoral en cáncer de mama [Wang, 2013^a], [Zhang, 2015^a] y próstata, [Li, 2015^a], entre otros, y como oncogén en cáncer de pulmón [Li, 2017] y de endometrio [Zhang, 2014^b]. Otros miRNAs con este comportamiento incluyen los miRNA-9, miRNA-200 y miRNA-181 [Meng, 2017], [Han, 2017^b], [Fang, 2014], [Huang, 2015], [Bisso, 2013].

IMPORTANCIA DE LOS MIRNAS COMO MARCADORES TEMPRANOS DE CÁNCER

Los niveles de expresión de conjuntos de miRNAs también están relacionados con las respuestas específicas del tumor a los tratamientos aplicados. Por ejemplo, en cáncer de pulmón de células pequeñas se ha comprobado que un conjunto de tres miRNAs presenta una elevada resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos y que su expresión descontrolada está asociada con una disminución en la supervivencia de los pacientes. En cáncer de páncreas, los pacientes con sobreexpresión de miRNA-142-5p presentan un índice de supervivencia mayor que los pacientes con una menor expresión del mismo, y en cáncer de mama ER⁺, la expresión de miRNA-210 está asociada con pronósticos clínicos desfavorables. Todo esto demuestra, una vez más, que estas pequeñas moléculas con funciones reguladoras actúan como biomarcadores moleculares de alto valor tanto diagnóstico como pronóstico, y cuyos niveles de expresión, además de predecir las respuestas a diversos tratamientos para combatir el cáncer [Cho, 2012], son capaces de discriminar de manera fiable entre individuos control y pacientes, e incluso entre los diversos subtipos moleculares de la neoplasia en estudio.

De una manera global, los miRNAs se presentan como biomarcadores de diagnóstico temprano (discriminando en fases iniciales entre tumores y tejidos sanos e incluso entre subtipos moleculares), de predicción/pronóstico (proporcionando información acerca de la evolución esperable de la neoplasia tras la aplicación de un tratamiento específico y en términos de supervivencia y recurrencia) y de seguimiento (informando acerca del curso y progreso de la enfermedad en tiempo real). Cabe destacar además que las variaciones de expresión de los miRNAs están asociadas con la heterogeneidad y los estados patológicos de la enfermedad [van Schooneveld, 2015], obteniéndose diferencias significativas en la expresión de conjuntos específicos de miRNAs (conocidos como “firmas” o “huellas moleculares” características) en función del escenario y etapa en la que se encuentre la neoplasia [Wen, 2014].

Se ha detectado la presencia de estos biomarcadores en tejidos, células, plasma, suero, lágrimas, orina, saliva, esputo, e incluso contenidos en vesículas extracelulares secretadas por las células, como los exosomas [Nedaeinia, 2017], [Li, 2015^b], [Yu, 2016^c], por lo que existen numerosas fuentes biológicas accesibles de manera no invasiva para la determinación de estos biomarcadores de relevancia.

METODOLOGÍAS PARA DETECCIÓN DE MIRNAS

Los métodos empleados convencionalmente para el análisis y detección de estos biomarcadores de naturaleza genética son:

- *qRT-PCR*: Este método, considerado de referencia para la cuantificación de la expresión de genes, se basa en la conversión del RNA al DNA complementario (cDNA) mediante transcripción reversa de tipo universal o específica, dependiendo de si las secuencias de los primers complementarios al miRNA son lineales o con estructura tipo bucle [Benes, 2010]. Tras la selección más conveniente de los primers, los productos de qPCR (o amplicones) obtenidos se detectan mediante la monitorización de la señal de fluorescencia de las moléculas empleadas como marcadores, e intercaladas en el DNA de doble cadena (ds-DNA) obtenido tras cada ciclo de amplificación, y cuya intensidad está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente [Nolan, 2006], para finalmente realizar la normalización e interpretación de los datos [Benes, 2010]. Cabe destacar que, aunque las técnicas de qRT-PCR presentan gran sensibilidad y se requiere poca cantidad de RNA de partida, su coste relativamente elevado, la formación de enlaces inespecíficos entre distintos reactivos y productos obtenidos a lo largo del proceso, el rendimiento medio de la técnica, la falta de consenso acerca de los genes control endógenos que deben ser usados para la detección de miRNAs y su aplicabilidad limitada principalmente a entornos centralizados, son algunos de sus principales inconvenientes [Usó, 2014].

- *Ensayo Northern Blot (NB)*: Consiste en la separación y fraccionamiento de moléculas pequeñas de RNA mediante la desnaturalización de geles de poliacrilamida por electroforesis, seguido de la transferencia y fijación del RNA del gel sobre una membrana cargada positivamente e hibridación del miRNA con oligonucleótidos de DNA marcados con ^{32}P para la visualización de los resultados obtenidos [Válóczi, 2004], [Pall, 2007]. Aunque este método permite la cuantificación de miRNAs maduros, pre-y pri-miRNAs [Ebhardt, 2010], [Starega-Roslan, 2011], [Koscianska, 2011], ofrece baja sensibilidad en comparación con otras metodologías [Johnson, 2014], baja frecuencia de análisis, requiere largos tiempos de ensayo, grandes cantidades de material genético (del orden de 5–50 μg de RNA_t por muestra) [Kim, 2010], [Ramkissoo, 2006] y son frecuentes las contaminaciones debido al marcaje isotópico empleado [Tian, 2015].

- *Microarrays*: El fundamento de esta metodología consiste en la hibridación de las moléculas diana de miRNAs con sondas complementarias previamente inmovilizadas sobre portamuestras formando un microarray para detectar un gran número de miRNAs, que se marcan con colorantes fluorescentes (fluoróforos) y que hibridan de manera específica con cada una de las sondas inmovilizadas, detectándose la emisión fluorescente de los miRNAs en distintas posiciones del mismo. Las etapas más importantes a tener en cuenta en este tipo de metodologías son el diseño de las sondas complementarias a los miRNAs, la preparación de las muestras y los procesos de marcaje [Li, 2009]. Entre sus ventajas y desventajas destacan, respectivamente, el elevado rendimiento de análisis y la sencilla validación, y el coste elevado y la disminución de especificidad debido a los sustratos empleados, que pueden afectar a la cinética de la reacción de hibridación [Liu, 2008].

- *Procesos de secuenciación de nueva generación (NGS)*: En estas metodologías se lleva a cabo la extracción del RNA de la muestra biológica seguida del aislamiento de los distintos tipos de RNA empleando los protocolos convenientes. A continuación, el RNA se transcribe a cDNA que se amplifica mediante PCR, para finalmente, secuenciar las librerías de RNA obtenidas [Kurkuba, 2015]. Aunque esta metodología permite detectar de una manera relativamente sencilla variaciones en las secuencias de miRNAs, estos procesos pueden introducir importantes errores durante la preparación de las librerías de genes obtenidas debido a problemas de contaminación [Chugh, 2012]. Además, la comprensión e interpretación de los resultados obtenidos empleando esta técnica requiere análisis bioinformáticos de elevada complejidad que limita su uso a personal especializado.

- *Hibridación in situ (ISH)*: Estos métodos determinan el nivel de expresión y la localización de los miRNAs de interés. En función del tipo de marcaje, se distingue entre metodologías ISH basadas en cromógenos enzimáticos, y metodologías ISH de fluorescencia, denominada comúnmente FISH (por sus siglas en inglés “Fluorescent In Situ Hybridization”) [Urbanek, 2015]. Su fundamento consiste en el empleo de sondas complementarias y convenientemente marcadas que hibridan con el DNA o RNA presente en la muestra de tejido, por lo que es posible evaluar la expresión de las biomoléculas de interés en los microambientes tumorales. Tanto la clásica ISH como FISH requieren oligonucleótidos específicos a las dianas de interés, y se diferencian en el modo de visualización de los resultados obtenidos. Mientras que ISH proporciona una mayor información genética en cuanto a la morfología tisular, FISH permite la visualización simultánea de varios miRNAs en

una misma muestra. Los marcadores que se emplean con mayor frecuencia son conjugados de AP y el cromógeno azul de nitrotetrazolio para el marcaje directo de oligonucleótidos modificados con biotina o digoxigenina (DIG) **[Nuovo, 2010]**.

Aunque ISH es un método con bastante potencial para la determinación de los niveles de expresión de miRNAs a nivel celular y tisular, para mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección es recomendable emplear ácidos nucleicos bloqueados o “Locked Nucleic Acids” (LNAs), que son RNAs bicíclicos con gran afinidad por sus dianas complementarias de DNA y RNA **[Planell-Saguer, 2013]**.

Uno de los principales problemas asociados con la detección de estos pequeños reguladores biológicos reside en su pequeño tamaño, y ya que la mayoría de los métodos existentes para su detección se basan en fenómenos de hibridación entre el miRNA de interés y su oligonucleótido complementario, el diseño de las sondas complementarias resulta bastante complejo y disminuye la selectividad del proceso de hibridación, traducándose en la obtención de falsos positivos **[Cissell, 2007]**. Su pequeña longitud de secuencia dificulta además la selección de los primers para su amplificación y su determinación empleando formatos de hibridación tipo sándwich, donde se requiere el empleo de dos sondas de longitud suficiente para asegurar una hibridación eficiente. Además, la elevada homología entre distintos miRNAs pertenecientes a una misma familia, la pequeña fracción (0.01 %) que suponen los miRNAs en la masa total de RNA y su bajo rango de concentración (desde pM en muestras con un mayor enriquecimiento de material genético, como células y tejidos, hasta aM en algunos fluidos biológicos complejos), hacen que la determinación fiable de estos biomarcadores resulte tremendamente compleja **[Pritchard, 2012]**.

Los biosensores de afinidad basados en estrategias que combinan la selectividad intrínseca de los procesos de hibridación o inmuno-reconocimiento, la elevada sensibilidad de la transducción electroquímica, el bajo coste, portabilidad, miniaturización y posibilidad de realizar análisis descentralizados, hace que los biosensores de afinidad electroquímicos sean considerados en la actualidad excelentes alternativas a los métodos convencionales para el análisis de oligonucleótidos de diferente longitud, incluyendo los miRNAs **[Wang, 2001]**, **[Campuzano, 2011^b]**.

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA ÁCIDOS NUCLEICOS

El proceso de hibridación que ocurre entre una secuencia de prueba (*probe*) y la secuencia diana (*target*) se puede monitorizar electroquímicamente a través de la electroactividad intrínseca de los ácidos nucleicos, del marcaje tanto del *target* como del *probe*, o mediante los cambios que ocurren en las propiedades o en la estructura del híbrido formado como consecuencia del proceso de hibridación [Paleček, 2012].

Los dispositivos de biosensado basados en ácidos nucleicos (NA), conocidos como genosensores o biosensores de DNA, se componen de una cadena sencilla de oligonucleótidos (DNA o RNA) inmovilizada sobre una superficie sólida capaz de reconocer e hibridar con su secuencia diana complementaria, de manera que el proceso de hibridación puede ser monitorizado mediante técnicas ópticas, electroquímicas, o dispositivos sensibles a cambios de masa. El desarrollo de genosensores cuenta con diversas aplicaciones en los campos del diagnóstico clínico, análisis genético y bioterrorismo, entre otros, lo que motiva el continuo desarrollo y mejora de estos dispositivos. Además, la detección de mutaciones genéticas a nivel molecular y de una amplia gama de biomarcadores clínicos abren la posibilidad de aplicar este tipo de estrategias para la realización de diagnósticos con elevada fiabilidad incluso antes de la aparición de los síntomas detectables clínicamente [Sassolas, 2008]. El principio general de la detección de NAs mediante la hibridación específica entre secuencias es fuertemente dependiente de factores como la fuerza iónica y la temperatura de la reacción de hibridación, que afectan directamente a la especificidad del proceso [Du, 2017].

Aunque convencionalmente las sondas de prueba inmovilizadas sobre la superficie sólida suelen ser de DNA o RNA, en la actualidad existen numerosas alternativas y otras variantes que pueden emplearse con la misma finalidad funcional, entre las que se incluyen los aptámeros y los ácidos nucleicos funcionales con propiedades enzimáticas (DNAzymes), entre otros, [Teles, 2008], [Li, 2010].

Como se ha comentado anteriormente, los aptámeros reconocen con gran afinidad a sus analitos diana gracias a las estructuras tridimensionales que adoptan. En comparación con los anticuerpos convencionales, estos receptores de afinidad destacan especialmente por su estabilidad a elevadas temperaturas (recuperando su conformación nativa en condiciones en las que los anticuerpos sufrirían una desnaturalización irreversible), sencillez de síntesis y modificación, baja inmunogenicidad (ya que no son reconocidos como agentes extraños por

el sistema inmune humano), y alta reactividad frente a ligandos no inmunogénicos u otros que los anticuerpos no reconocen [Song, 2012], como adenosina trifosfato (ATP) y cocaína [Du, 2017] ampliando la ventana de aplicación de los mismos.

Las DNAzymes son moléculas generadas por procesos de selección *in vitro* con elevada especificidad hacia iones metálicos [Gong, 2015], [Wang, 2014], [Willner, 2008] capaces de actuar sobre sustratos específicos selectivamente en presencia de ciertos cofactores metálicos o aminoácidos. Las DNAzymes G-cuádruple desempeñan sus funciones en presencia de algunos iones metálicos como K^+ y Pb^{2+} , y muestran actividad tipo peroxidasa en presencia de hemina. Estas entidades moleculares han sido empleadas como elementos de reconocimiento o marcaje enzimático en un gran número de biosensores [Ren, 2015], al igual que otras variantes como los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y los LNA, que presentan un esqueleto compuesto por unidades de N-(2-aminoetil) glicina [Nielsen, 1991] o monómeros de ribosa modificados con un grupo metileno [Koshkin, 1998], [Obika, 1998], respectivamente. Cabe resaltar que estas secuencias, aunque a veces pueden proporcionar una mayor selectividad y sensibilidad en el análisis que los oligonucleótidos naturales, requieren ciertas pautas para su síntesis, lo que hace que su aplicación no se haya explorado ampliamente hasta la fecha en el desarrollo de biosensores de alto rendimiento [Briones, 2012].

La inmovilización de secuencias de DNA y RNA sobre superficies electródicas para la obtención de biosensores de sensibilidad y selectividad apropiadas, puede llevarse a cabo mediante: procesos de adsorción sin necesidad de modificar la sonda de prueba [Pividori, 2000], interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos de la secuencia de DNA o RNA, cargados negativamente, y la superficie sólida cargada positivamente [Taufik, 2011], enlaces covalentes, caracterizados por su estabilidad, flexibilidad, alta fuerza de unión y prevención de la desorción de las moléculas inmovilizadas, y mediante sondas modificadas con grupos –SH a superficies de oro [Lu, 2007]. La inmovilización de sondas de DNA o RNA sobre superficies de oro se realiza normalmente mediante fenómenos de quimisorción a partir de SAMs entre el grupo–SH del oligonucleótido modificado y la superficie metálica [Ajore, 2007], [Li, 2008] gracias a la fuerte interacción entre los grupos tiol y el oro (Au-S) [Sassolas, 2008]. Este protocolo destaca por su sencilla preparación y por la elevada estabilidad y reproducibilidad del enlace formado [Qiu, 2013], [Zhang, 2015^b]. Otras metodologías comunes empleadas

para la inmovilización de estas biomoléculas están basadas en interacciones de afinidad, como la interacción biotina-estreptavidina, [Rahman, 2015] de gran estabilidad y resistencia a temperaturas y pH extremos, agentes desnaturalizantes y disolventes orgánicos [Rashid, 2017].

Al igual que ocurre con los receptores de afinidad de tipo proteico, todas estas metodologías son fácilmente combinables con materiales de todo tipo (AuNPs [Zeng, 2011], estructuras orgánicas metálicas (MOFs) [Wang, 2017^b], MBs [Rahi, 2015], etc), lo que amplía tremendamente el abanico de posibilidades para diseñar y fabricar biosensores “a la carta” capaces de satisfacer las necesidades específicas de cada aplicación particular. A pesar de las excelentes características y propiedades que ofrecen estos dispositivos por sus propiedades intrínsecas, resulta evidente que su combinación racional con el empleo de bio-receptores novedosos (proteínas virales y anticuerpos selectivos a oligo-híbridos) y diversas estrategias de amplificación, mejoran significativamente su rendimiento operacional, incrementando considerablemente la sensibilidad, estabilidad y/o selectividad que proporcionan. Como demostrarán gran parte de los resultados de esta Tesis Doctoral, estas capacidades mejoradas han permitido a los biosensores electroquímicos abordar y dar respuesta exitosa a problemáticas de gran relevancia que no pueden resolver las estrategias convencionales, demostrando aplicaciones pioneras existentes, hasta hace poco, solo en la imaginación de unos cuantos.

2.3.2.1. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO BIO-RECEPTORES SELECTIVOS

A pesar de su enorme relevancia biológica en el diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta frente a tratamientos específicos [Tiberio, 2015], los inconvenientes asociados a la detección y cuantificación de miRNAs, comentados anteriormente, demandan metodologías adecuadas para su determinación sensible, selectiva y fiable.

Las proteínas virales desempeñan importantes funciones en mecanismos celulares interaccionando con moléculas de DNA y RNA de pequeño tamaño, con afinidad variable. Algunas de las más conocidas son las proteínas de unión a cadenas sencillas de DNA (SSB), la proteína viral p21 de la remolacha amarilla [Berezovski, 2003], la proteína p19 de Tombusvirus, y proteínas Tospovirus supresoras del silenciamiento de RNA [Schnettler,

2010]. Entre ellas, la proteína p19 es una de las más estudiadas tanto desde el punto de vista estructural como funcional **[Cheng, 2009], [Ye, 2003]**.

El RNA sencillo (ss-RNA) del genoma de los Tombusvirus codifica para una proteína de 19 kDa conocida como proteína p19 del virus de mancha anular de Carnation Italiano (CIRV p19), capaz de enlazar y secuestrar a siRNAs evitando su incorporación en el complejo proteico RISC **[Vargason, 2003]**. El mecanismo de funcionamiento de la p19 se basa en la captura de dobles cadenas de RNA (ds-RNA) con elevada especificidad independientemente de su secuencia, pero con afinidad muy dependiente del tamaño del homohíbrido de RNA y sin afinidad observada hacia otras especies genómicas como ss-RNA, rRNA, mRNA, ss-DNA y ds-DNA. El complejo p19-ds-RNA se forma como consecuencia de interacciones electrostáticas y enlaces por puente de hidrógeno formados entre las láminas β de la proteína p19 y los grupos fosfatos del ds-RNA, lo que demuestra que esta interacción resulta independiente de la secuencia del ds-RNA **[Khan 2011]**, y que este sistema de reconocimiento pueda trasladarse a la detección de cualquier miRNA previamente hibridado con su sonda de RNA complementaria siempre que se mantengan los requerimientos de longitud del híbrido para el reconocimiento por la p19 **[Degliangeli, 2014]**. Desde el punto de vista estructural, la p19 existe disponible comercialmente como una proteína de fusión bifuncional con un dominio de unión a maltosa (MBD) en el extremo N_t y un dominio de unión a quitina (CBD) en el extremo C_t, los cuales pueden aprovecharse tanto para su inmovilización efectiva sobre partículas magnéticas funcionalizadas con quitina **[Jin, 2014]** como para su marcaje enzimático con un anticuerpo capaz de reconocer el dominio MBD. En relación a su afinidad frente a homohíbridos de RNA, ésta es máxima para híbridos de longitud comprendida entre 19 y 20 nts con extremos romos fosforilados en las terminaciones 5' **[Jin, 2010]**, ya que las interacciones que se producen entre los residuos de triptófano de la proteína y los grupos fosfatos de este tipo de homohíbridos favorecen la estabilización del dímero p19-ds-RNA **[Khan, 2011]**.

Diversos estudios realizados sobre su estructura demuestran que esta proteína actúa como una especie de “tenaza” o “pinza molecular” capaz de secuestrar homohíbridos de RNA por sus extremos, de un determinado tamaño, e independiente de su secuencia. De todas las proteínas virales involucradas en mecanismos de supresión de siRNAs, la p19 presenta la mayor afinidad hacia siRNAs con una longitud comprendida entre 20 y 22 nts ($K_d \sim 0.2$ nM)

que disminuye drásticamente para siRNA con secuencias de mayor o menor longitud [Danielson, 2013].

En el proceso de biogénesis de los miRNAs, una vez que el pre-miRNA es procesado en el dúplex maduro, el grupo monofosfato del extremo 5' de la sonda guía (miRNA maduro) enlaza con los dominios de la proteína Ago [López-Orozco, 2015], [Graves, 2012] para incorporarse al complejo proteico RISC. Esto demuestra que la proteína p19 no requiere ninguna etapa extra de modificación del miRNA diana para poder interactuar con el dúplex que lo contiene, y que el único requisito es la presencia del grupo fosfato en el extremo 5' del miRNA.

Estas propiedades únicas que ofrece la p19 para el reconocimiento de pequeños RNAs no codificantes se demuestran, entre muchos otros, en los trabajos de Nasheri y col. [Nasheri, 2011] y Fang y col. [Fang, 2006], en los que emplearon esta proteína para la detección de miRNAs mediante inmunoensayos y resonancia de plasmón superficial (SPR), respectivamente. Estas estrategias proporcionaron muy buenas sensibilidades sin realizar etapas previas de amplificación por PCR [Qavi, 2010], lo que reduce el tiempo y el coste del ensayo y simplifica considerablemente el procedimiento de análisis.

La elevada afinidad de esta proteína para la determinación de homohíbridos de RNA de determinada longitud, ofrece extraordinarias posibilidades para su empleo en el desarrollo de plataformas que permitan la determinación simultánea de diferentes miRNAs con sensibilidades similares tras su hibridación con sondas de RNA complementarias.

Así, se han desarrollado metodologías basadas en el empleo de la p19 que ofrecen características muy atractivas tanto para la determinación óptica como electroquímica de miRNAs, en ausencia de complejos procedimientos de pre-amplificación, marcaje y post-hibridación de los miRNAs diana, características que las hacen estrategias altamente competitivas, novedosas, y versátiles, aplicables a la determinación de cualquier miRNA, y fácilmente implementables en dispositivos POC. Sin embargo, es importante destacar que aunque este tipo de bio-receptores novedosos ha supuesto un importante avance para la determinación de miRNAs y otros RNAs de pequeño tamaño, un mayor conocimiento de los procesos de interacción proteína-ds-RNA, el desarrollo de nuevas técnicas de recombinación que mejoren la eficiencia en la expresión de este tipo de receptores, y la funcionalización de los mismos con todo tipo de marcajes adaptables al tipo de ensayo requerido en cada caso,

resulta esencial para abrir nuevos horizontes en el diagnóstico de enfermedades aplicando estas estrategias tan prometedoras [Campuzano, 2016].

Otro ejemplo de receptores de afinidad relevantes cuyas propiedades pueden ser explotadas para la detección de miRNAs y otros marcadores de naturaleza genética, son los anticuerpos y las proteínas de dedo de zinc (ZNF), con elevada especificidad hacia heterohíbridos de DNA–RNA.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal S9.6 (Ab S9.6), generado *in vitro* en ratones usando el antígeno sintético ϕ X174 DNA–RNA, presenta gran especificidad y afinidad hacia híbridos de DNA–RNA reconociendo epítomos de, aproximadamente, 6 pares de bases (bp) [König, 2017]. A diferencia de la p19, Ab S9.6 no presenta ningún tipo de restricción en cuanto al tamaño del híbrido, por lo que puede emplearse para el análisis de cualquier miRNA y otros RNAs independientemente de su tamaño [Campuzano, 2017^d]. Además, el empleo de Ab S9.6 para la detección de RNAs implica la necesidad de llevar a cabo una etapa de hibridación previa entre la secuencia diana y su sonda complementaria de DNA, lo que introduce importantes ventajas frente al uso de la p19 como elemento de reconocimiento dada la mayor estabilidad del DNA en comparación con la del RNA [Degliangeli, 2014], debido principalmente a su estructura química y a la menor prevalencia de DNAsas en condiciones normales del laboratorio.

Así, al igual que la proteína p19, el anticuerpo S9.6 se presenta como una excelente alternativa para el análisis sensible, específico, sencillo y rápido de miRNAs y otros tipos de RNAs de relevancia en el campo clínico. Los biosensores basados en Ab S9.6 descritos hasta la fecha, demuestran en general mejor sensibilidad que los basados en el empleo de la p19, con la ventaja adicional de que los procesos de inmovilización y orientación de anticuerpos están más controlados y establecidos que los de las proteínas virales [Campuzano, 2017^d].

Las ZNF, por otro lado, enlazan híbridos homólogos de DNA (ds-DNA) [Kim, 2011], [Noh, 2015], pero algunos tipos, como JAZ, ZNF346 y la proteína específica 1 (SP1) pueden reconocer también con gran afinidad híbridos DNA–RNA o RNA–RNA [Burge, 2014], [Iuchi, 2001], [Fang, 2017].

Los complejos proteína-híbrido formados por la p19, el anticuerpo S9.6 y la proteína de dedo de zinc se esquematizan en la **Figura 16**.

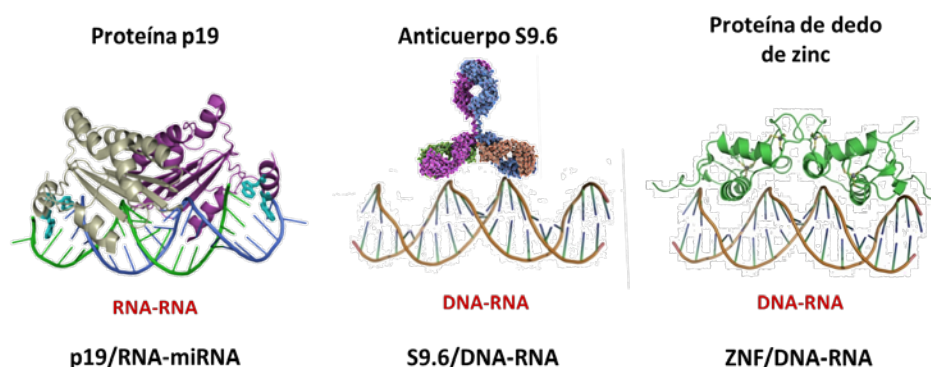


Figura 16: Complejos de la proteína p19, el anticuerpo S9.6 y la proteína de dedo de zinc frente a homo- y hetero-híbridos de RNA.

Aunque desde el punto de vista de la sensibilidad analítica alcanzada, Ab S9.6 y ZNF proporcionan los mejores resultados, la p19 también presenta importantes ventajas derivadas de su afinidad restringida hacia híbridos de RNA de un determinado tamaño. Teniendo en cuenta que la unión de la p19 se produce fundamentalmente por interacciones con los extremos del homohíbrido de RNA, es de esperar que pequeñas modificaciones en esta parte del dúplex se traduzcan en una disminución de la afinidad de la proteína hacia el mismo. Un tipo de degradación que pueden sufrir los miRNAs es la que se conoce con el nombre de degradación de miRNAs dirigida por RNA diana (TDMD), que se basa en la presencia de sondas de mRNA con gran complementariedad frente a un miRNA determinado y que puede provocar la degradación del miRNA mediante mecanismos basados en la adición de nucleótidos al extremo 3' del mismo, seguido del recorte del miRNA. Este proceso ocurre principalmente en los miRNAs de los mamíferos que, a diferencia de otros miRNAs, no están protegidos frente a la degradación con grupos 2'O-metilo en sus extremos 3' [Haas, 2016]. En este sentido, las metodologías basadas en la proteína p19, aunque menos sensibles, son más restrictivas en cuanto a la interacción y captura del híbrido, y por ello, es de esperar que la afinidad frente a híbridos formados por el miRNA maduro funcional y su sonda exógena de RNA complementaria disminuya considerablemente cuando el miRNA maduro ha sufrido algún proceso de degradación, lo que asegura que la p19 captura de manera única y fiable el miRNA con actividad funcional y con interés clínico para el diagnóstico y pronóstico de diversas neoplasias.

En las **Tablas 4 y 5** se resumen algunos de los trabajos más recientes descritos para la determinación electroquímica de miRNAs empleando estos elementos de reconocimiento con elevada afinidad hacia híbridos particulares de RNA, como bio-receptores de captura y de detección, en muestras clínicas de distinta naturaleza. Es importante destacar que estas metodologías aúnan la elevada afinidad de estos bio-receptores hacia híbridos particulares de RNA con la selectividad de los procesos de hibridación.

Tabla 4: Estrategias electroquímicas desarrolladas para la determinación de miRNAs basadas en el empleo de la proteína viral p19 como elemento de reconocimiento.

Electrodo	Papel bio-receptor	Tipo de inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	LD	Referencia
GPE previamente activado	Captura	Inmovilización pasiva entre p19-ds-RNA y GPE	miRNA-21	DPV	RNA _t de la línea celular PBS1	1.6 pmol (10 µL muestra)	[Kilic, 2013]
SPGNP	Detección	Interacción Au y sonda SH-RNA	miRNA-21, miRNA-32 y miRNA-122	SWV (Ru(NH ₃) ₆ ³⁺) ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	Muestras de suero	5 amol (30 µL muestra)	[Labib, 2013]
SPCE-AuNPs	Detección (+ anti-MBP-HRP)	Interacción Au y sonda SH-RNA	miRNA-21	Amperometría (E _{app} = -0.2 V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	RNA _t de células de cáncer de mama	142 fM	[Zouari, 2018 ^a]
SPCE-AuNPs-DOTE-DOTAP	Detección	Interacción electrostática entre cargas negativas de RNA y cargas positivas de liposomas catiónicos (DOPE y DOTAP)	miRNA-124a miRNA-221 miRNA-21	DPV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	----	5 fM	[Ghazizadeh, 2018]

Abreviaturas utilizadas: **Au:** oro; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **DOPE:** dioleoil fosfatidil etanolamina; **DOTAP:** 1, 2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **ds-RNA:** RNA de doble cadena; **GPE:** electrodo de lápiz de grafito; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa de rábano; **LD:** límite de detección; **MBP:** dominio de unión a maltosa; **miRNA:** micro-RNA; **p19:** proteína viral p19; **RNA_t:** RNA total; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **SPGNP:** electrodo serigrafiado de oro modificado con nanopartículas de oro.

Tabla 5: Estrategias electroquímicas desarrolladas para la determinación de miRNAs basadas en el empleo de Ab S9.6 y ZNF como elementos de reconocimiento.

Electrodo	Bio-receptor/ Función	Tipo de inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	LD	Referencia
CP/RGO/GCE	Ab S9.6/Detección	Enlace covalente entre NH ₂ -DNA y CP/RGO/GCE mediante EDC/NHS	miRNA-29b-1 y miRNA-141	SWV	---	5 fM	[Tran, 2013]
SPAUE modificado con RGO y o-MWCNT	Ab S9.6-HRP/Detección	Enlace covalente entre NH ₂ -DNA y o-MWCNTs mediante EDC/NHS	miRNA-29b-1 y miRNA-141	SWV (H ₂ O ₂ /HQ)	---	10 fM	[Tran, 2014]
GCE/AuNPs	Ab S9.6-AP/Detección	Interacción SH-DNA y AuNPs	miRNA-319a	DPV (p-nitrofenol)	Semillas de arroz	0.4 fM	[Wang, 2015 ^b]
SPCE	Ab S9.6/Detección	Interacción por afinidad (Estrep- biotina) (Estrep-MBs)	miRNA-21	Amperometría (E _{app} = -0.2 V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	RNA, de células y tejidos frescos de cáncer de mama	0.4 pM	[Vargas, 2017]
Electrodo ITO modificado con pSAM	JAZ, ZNF346- AP/Detección	Inmovilización NH ₂ - DNA sobre pSAM/ITO	miRNA-21	Cronoculombimetría ((Ru(NH ₃) ₆) ³⁺ , HQ, TCEP)	Muestras de suero contaminadas con miRNA-21	2 fM (buffer) 30 fM (suero 1:10)	[Fang, 2017]

Abreviaturas utilizadas: **Ab S9.6:** anticuerpo S9.6; **AP:** fosfatasa alcalina; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **CP:** polímero conductor; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; **Estrep:** estreptavidina; **GCE:** electrodo vitrificado de carbono; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa de rábano; **ITO:** óxido de indio y estaño; **JAZ, ZNF346:** proteína de dedo de zinc; **LD:** límite de detección; **miRNA:** micro-RNA; **o-MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados; **NH₂:** grupo amino; **NHS:** N-hidroxisuccinimida; **pSAM:** monocapa autoensamblada polimérica; **RGO:** óxido de grafeno reducido; **SPAUE:** electrodo serigrafado de oro; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **TCEP:** tris(2-carboxietil)fosfina.

En relación a las estrategias basadas en la proteína p19 como elemento de reconocimiento, Kilic y col. [Kilic, 2013] desarrollaron un biosensor electroquímico para la determinación de miRNA-21 en líneas celulares, sobre electrodos de grafito tipo lápiz (GPE). En una primera etapa, se produce la hibridación del miRNA-21 con una sonda complementaria sintética de RNA en disolución, y a continuación, los híbridos de miRNA–RNA formados, son capturados por la p19, presente también en disolución. La detección de miRNA-21 se realiza sumergiendo el GPE, previamente activado, en la mezcla que contiene el complejo p19-miRNA–RNA produciéndose la inmovilización pasiva del mismo sobre la superficie electródica y monitorizándose la oxidación de los residuos de triptófano de la p19 a +0.80 V (vs. electrodo Ag/AgCl) mediante DPV. La aplicabilidad de este biosensor se demostró determinando el contenido endógeno del miRNA diana en muestras de RNA_t extraído de la línea celular PBS1.

En el trabajo de Labib y col. [Labib, 2013] se propuso un biosensor basado en tres modalidades de detección y aplicable a la determinación de tres miRNAs de relevancia (miRNA-21, miRNA-32 y miRNA-122) en cáncer de colon, próstata e hígado, en muestras de suero. Esta plataforma biosensora proporcionó una excelente selectividad frente a secuencias de miRNAs diana con una única base desapareada en posición central y terminal y es capaz de discriminar entre miRNAs con distinto contenido de A/U y G/C. Las modalidades de detección consisten en procesos de hibridación entre el miRNA diana y su sonda de RNA complementaria correspondiente (H-SENS), la captura específica del híbrido de RNA por la proteína p19 funcionalizada con un tag de histidinas (His-Tag p19) (P-SENS), y el desplazamiento de la proteína viral en presencia de una concentración elevada de híbrido de RNA en disolución. En los tres casos la detección se realizó mediante SWV entre –0.4 y +0.8 V en presencia de K₃[Fe(CN)₆] y [Ru(NH₃)₆]Cl₃. Los autores demostraron que la adición de la p19 amplifica significativamente la respuesta obtenida tras el simple proceso de hibridación permitiendo la detección ultrasensible de miRNAs, y que el desplazamiento de la p19 permite detectar cualquier miRNA sin necesidad de emplear sondas complementarias de RNA funcionalizadas. La combinación de estas tres modalidades, que proporcionó una triple confirmación para la detección fiable del miRNA objeto de estudio, se llevó a cabo sobre electrodos de oro serigrafiados y modificados con AuNPs (SPGNP) para la detección secuencial de miRNA-32 y miRNA-122, mediante la inmovilización de sondas de RNA tioladas y complementarias al miRNA-32, hibridación con el mismo y captura del híbrido inmovilizado

por la p19, y desplazamiento de la proteína viral en presencia de elevadas concentraciones de híbridos de miRNA-122, obteniéndose un rango lineal operacional que abarca 11 órdenes de magnitud (10 aM – $1 \text{ }\mu\text{M}$) y un LD de 90 moléculas de miRNA/30 μL de muestra.

Más recientemente, Zouari y col. [Zouari, 2018^a] emplearon la proteína p19 como elemento detector en el desarrollo de biosensores amperométricos implementados sobre SPCEs modificados con AuNPs (SPCE-AuNPs) y SAMs de sondas de RNA tioladas complementarias al miRNA a determinar (miRNA-21). Tras la hibridación específica del miRNA diana sobre los transductores electroquímicos funcionalizados con la sonda complementaria de RNA, la proteína p19 reconoce los homohíbridos inmovilizados para, posteriormente, llevar a cabo su marcaje enzimático empleando un anticuerpo conjugado con HRP específico para el dominio MBP de la p19 empleada (anti-MBP-HRP), y realizando la transducción amperométrica en presencia del sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$. Con esta sencilla estrategia los autores alcanzan un LD de 142 fM para la detección de miRNA-21, y un rango lineal operacional comprendido entre 0.5–50 pM. Este trabajo destaca por el reducido tiempo de ensayo (60 minutos, una vez modificados los transductores electroquímicos con las sondas de RNA, y 8 horas para la obtención de la superficie RNA-SH-SPCE-AuNPs, frente a los 5 días que requiere la preparación de la superficie electródica empleando el protocolo de Labib y col. [Labib, 2013]), la excelente selectividad obtenida frente a secuencias de miRNA-21 con una única base desapareada, y la elevada estabilidad (2 meses) de la superficie electródica modificada sin pérdida significativa de la sensibilidad para la detección del miRNA diana, aspectos que resultan tremendamente atractivos para la aplicación de este tipo de dispositivos en determinaciones rutinarias. Finalmente, la aplicabilidad de la estrategia se confirmó determinando el contenido endógeno de miRNA-21 en tan solo 50 ng de RNA_t extraído de células tumorigénicas (MCF-7) y no tumorigénicas epiteliales (MCF-10A) de mama.

Ghazizadeh y col. [Ghazizadeh, 2018] han propuesto recientemente un biosensor electroquímico basado en SPCE modificados con AuNPs, liposomas catiónicos 1,2-dioleoyl-3-trimetilamoniopropano y dioleoylfosfatidiletanolamina (DOTAP/DOPE) y la proteína p19 como elemento detector, para la determinación, mediante DPV, de miRNA-221, miRNA-124a y miRNA-21. La estrategia consistió en la formación de diversas estructuras de doble cadena de RNA empleando sondas quimera “stem” y lineales para evaluar la función de reconocimiento de la proteína p19 hacia los distintos híbridos formados. La falta de

accesibilidad que muestra la p19 hacia los híbridos formados por el miRNA correspondiente y su sonda quimera complementaria, produce una disminución en la respuesta electroquímica del sensor, mientras que la adición de un híbrido de RNA al sistema que la p19 reconoce de manera apropiada, desencadena el aumento de la señal medida. Tras la modificación de los SPCE modificados con AuNPs y DOTAP/DOPE, se lleva a cabo la inmovilización de una mezcla de sondas tipo “stem” y lineales complementarias a miRNA-221 y miRNA-124a, respectivamente, que hibridaban en una etapa posterior con el miRNA correspondiente. A continuación, la superficie transductora modificada se incubaba con la proteína p19, y finalmente, se añadía al sistema el híbrido miRNA-21–RNA formado, llevándose a cabo la monitorización de los cambios en la señal amperométrica obtenida mediante DPV entre -0.4 y $+0.4$ V como consecuencia de la accesibilidad de la p19 hacia los distintos híbridos de RNA presentes. El sensor desarrollado, con un LD de 5 fM y un rango lineal comprendido entre 500 aM–1.0 nM, se aplicó a la determinación simultánea de los tres miRNAs propuestos sobre el mismo dispositivo, en 2 horas y con buena selectividad.

En cuanto a las estrategias electroquímicas para la detección de miRNAs empleando anticuerpos selectivos a heterohíbridos de DNA–RNA, todos los trabajos descritos hasta la fecha se basan en este receptor como elemento de detección.

Tran y colaboradores desarrollaron en el año 2013 y 2014 dos biosensores electroquímicos para la detección de miRNA-29b-1 y miRNA-141, importantes biomarcadores asociados a enfermedades cardiovasculares y cáncer de próstata, respectivamente, alcanzándose LDs en el rango de fM [Tran, 2013], [Tran, 2014].

El biosensor desarrollado en el primer trabajo [Tran, 2013] consistía en el empleo de electrodos de carbono vitrificado modificados con óxido de grafeno reducido (RGO) y un polímero conductor formado mediante la electropolimerización del ácido 3-(5-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftaleno-2(3)-il) propanoico (JUGA) y 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (JUG) (JUGA-co-JUG). Las sondas de DNA específicas a cada miRNA funcionalizadas con grupos $-NH_2$ se inmovilizaron covalentemente sobre la superficie transductora mediante “grafting” empleando EDC/NHS y, tras la hibridación con el miRNA, los heterohíbridos formados eran reconocidos por el anticuerpo S9.6 específico formándose el complejo Ab/DNA–RNA. Mediante SWV se monitorizaba la disminución de la señal obtenida como consecuencia del impedimento estérico ocasionado por el complejo anterior, inmovilizado sobre la superficie

electródica. Además de llevar a cabo la comparación del funcionamiento del sensor empleando dos tipos de anticuerpos específicos a heterohíbridos DNA–RNA (un anticuerpo policlonal antipoly(A)-poly(dT) y el anticuerpo monoclonal de ratón Ab S9.6), que proporcionaron resultados similares, los autores demostraron que la formación del complejo Ab/DNA–RNA es un proceso reversible y que en presencia de concentraciones elevadas de heterohíbridos DNA–RNA en disolución, podían disociarse. De esta manera, las distintas etapas que tienen lugar sobre el electrodo (hibridación del miRNA con su sonda de DNA complementaria, reconocimiento específico de los heterohíbridos de DNA–RNA por el Ab y disociación del complejo Ab/DNA–RNA con la consiguiente liberación del Ab a la disolución), hacen que el dispositivo desarrollado proporcione una triple confirmación y combine la eficiencia de los procesos de hibridación con la selectividad de los anticuerpos, obteniéndose respuestas electroquímicas para cada etapa secuencial de tipo *On*, *Off* y *On*, respectivamente, en función del impedimento estérico que se produzca sobre la superficie del electrodo.

Estos mismos autores desarrollaron otro inmunosensor electroquímico empleando amplificación enzimática para la detección de miRNA-29b-1 y miRNA-141 mediante el mismo tipo de inmovilización de las sondas de DNA sobre electrodos serigrafiados de oro (SPAuEs) modificados con un compósito de RGO y MWCNTs [Tran, 2014]. Tras la hibridación del DNA con el miRNA correspondiente y el reconocimiento del heterohíbrido DNA–RNA por el anticuerpo S9.6, éste se marca con un anticuerpo secundario que reconoce el conjunto Ab/DNA–RNA, monitorizando la señal de reducción del mediador redox empleado (HQ) en presencia de H₂O₂ mediante SWV y obteniéndose LDs del orden de fM.

Sin embargo, es importante destacar que a pesar de las excelentes características analíticas que proporcionan, ninguna de estas metodologías ha demostrado aplicabilidad para el análisis en muestras reales.

Wang y col. [Wang, 2015^b] también propusieron un biosensor voltamperométrico aplicable a la determinación de miRNA-319a en muestras de RNA_t extraído de semillas de arroz. En este trabajo se inmovilizaban sondas de DNA tioladas sobre electrodos de carbono vitrificado nanoestructurados con AuNPs. Tras la hibridación con el miRNA diana, los heterohíbridos DNA–RNA formados se reconocen con el Ab S9.6 que se conjuga a su vez con un anticuerpo secundario modificado con la enzima AP, monitorizando mediante DPV la oxidación de p-nitrofenol catalizada por AP. Los resultados obtenidos con el biosensor para

el análisis de miRNA-319a en las muestras de RNA_t analizadas eran concordantes con los obtenidos mediante qRT-PCR.

Es importante resaltar que, dada la gran versatilidad de este tipo de receptores de afinidad, es posible combinarlos con diversos nanomateriales, polímeros y proteínas conjugadas con todo tipo de entidades enzimáticas (como polímeros de Estrep-poli-HRP y ProtA-poli-HRP, entre otros), tal y como demuestran Vargas y col. [Vargas, 2017] en uno de sus trabajos más recientes, que consistió en el desarrollo de un biosensor amperométrico para la determinación, en un solo paso, de miRNA-21 en extractos de RNA_t de líneas celulares y tejidos de mama. El dispositivo desarrollado se basa en el empleo de Estrep-MBs sobre las que se inmovilizaba la sonda de DNA biotinilada complementaria al miRNA objeto de estudio, empleadas para la captura eficiente del miRNA diana mediante su hibridación con la sonda de DNA inmovilizada en su superficie. El Ab S9.6 reconoce los heterohíbridos capturados sobre las MBs y, tras el marcaje enzimático de los anticuerpos empleando ProtA conjugada a un homopolímero que contiene 40 unidades de HRP (ProtA-poli-HRP40) se realiza amperometría empleando el sistema H₂O₂/HQ. El LD (0.4 pM) y la selectividad obtenidos resultaron apropiados para la determinación del contenido endógeno de miRNA-21 en 250 ng de RNA_t extraído de líneas celulares tumorales y no tumorales (MCF-7 y MCF-10A) y de tejidos frescos (pareados tumorales/normales) de mama, obteniéndose resultados concordantes con los descritos por otros autores. Además de llevar a cabo la detección del miRNA diana en un único paso y en 30 minutos, los autores demostraron que, en caso necesario, era posible llevar a cabo la determinación del miRNA en tan solo 15 minutos sin pérdida significativa de sensibilidad.

En cuanto a ZNF, hasta la fecha tan solo se ha descrito un biosensor que explota la afinidad de esta proteína por heterohíbridos DNA–RNA, para llevar a cabo la determinación de miRNA-21 en muestras de suero. Esta metodología se basa en la inmovilización de sondas complementarias de DNA modificadas con –NH₂ sobre electrodos ITO modificados con una monocapa autoensamblada polimérica compuesta por poli(etilenglicol)metil éter metacrilato, 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato y acrilosuccinimida (poli(TMSMA-r-PEGMA-r-NAS). Tras la hibridación con miRNA-21, la proteína de dedo de zinc conjugada con la enzima AP (JAZ, ZNF346-AP) reconoce de manera selectiva los heterohíbridos y se realiza la detección electroquímica de los conjugados proteicos sobre la superficie del transductor mediante una

amplificación secuencial de la señal en la que intervienen HQDP (hidroquinona difosfato) convertida a HQ (hidroquinona) mediante JAZ-AP y $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, para generar BQ (benzoquinona) y $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$. Así, la BQ generada reacciona con TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) produciendo HQ y la forma oxidada de TCEP, que en presencia de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ genera un ciclo de procesos redox cuya variación de carga resulta directamente proporcional a la concentración de miRNA-21 en la muestra. La selectividad para discriminar entre el miRNA diana y secuencias con una única base desapareada y la sensibilidad que ofrece (LD de 2 fM e intervalo lineal operacional entre 2 fM–1 nM de miRNA-21) hicieron factible la aplicación de esta metodología en muestras de suero convenientemente diluidas y en las que se demostró un LD de 30 fM [Fang, 2017].

Como se puede concluir, las excelentes propiedades que caracterizan a este tipo de bio-receptores de afinidad han permitido el desarrollo de biosensores que ofrecen excelentes prestaciones analíticas y aplicabilidad práctica demostrada en muestras complejas empleando protocolos sencillos y tiempos de ensayo reducidos, aspectos que les convierte en candidatos ideales para satisfacer las demandas de la clínica actual.

2.3.2.2. DETERMINACIÓN DE microRNAs MEDIANTE ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN

Normalmente la sensibilidad de un biosensor depende de la relación establecida entre la concentración de la molécula diana y la señal obtenida como consecuencia de su presencia. Algunos analitos, como los biomarcadores tumorales y moléculas de DNA circulantes, se encuentran en concentraciones tan bajas que son difícilmente detectables empleando los métodos tradicionales de biosensado [Miao, 2015^a]. En este contexto y como se ha descrito previamente, la baja concentración de estas moléculas en fluidos biológicos y en células (< 1 pM y alrededor de 1000 moléculas/célula, respectivamente) hace necesario el desarrollo de dispositivos ultrasensibles basados en una amplificación de la señal [Ciui, 2017], con vistas a la determinación de cualquier miRNA, sea cual sea su nivel de expresión y en cualquier tipo de muestra, especialmente en aquellas en las que interese determinar miRNAs con expresión reducida o menor número de copias.

Puesto que la concentración de RNA extraído de distintos fluidos biológicos varía significativamente en un rango de concentración comprendido entre 113–48240 ng μL^{-1} , la concentración de miRNAs también está sujeta a este tipo de variaciones y su distribución

depende del tipo de muestra en el que se pretenda determinar, tal y como se muestra en la **Figura 17**, en la que se ejemplifica la distribución del miRNA-302c en diversos fluidos biológicos [Weber, 2010].

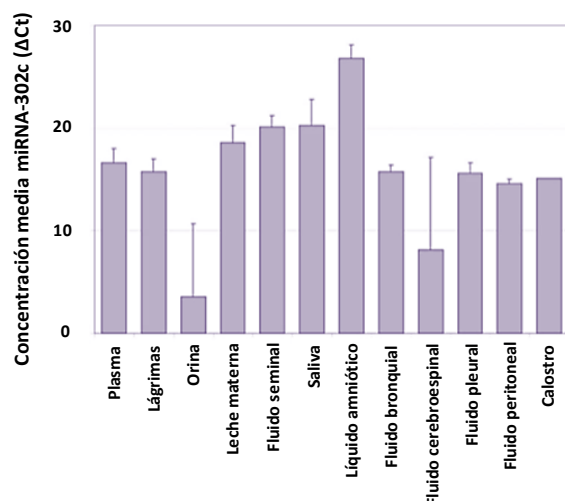


Figura 17: Variabilidad en la expresión de un miRNA (miRNA-302c) dependiendo del fluido biológico analizado.

Así, en función del miRNA y del tipo de muestra en el que esté contenido, puede requerirse una mayor sensibilidad y selectividad de ensayo, características que pueden mejorarse considerablemente mediante el empleo de nanomateriales y/o estrategias que amplifiquen la señal analítica medida.

Entre los materiales más utilizados para la amplificación de la señal aplicados a la detección electroquímica de miRNAs destacan AuNPs, GO, MWCNTs y las nanovarillas de oro (GNRs) [Campuzano, 2017^e], entre otros.

En cuanto a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, pueden clasificarse como *técnicas de amplificación termocíclica*, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y *técnicas de amplificación isoterma*, más compatibles con su implementación en dispositivos POC, y que incluyen, entre otras, la amplificación dependiente de la helicasa (HDA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), [Bi, 2017], y la formación de concatámeros de DNA [Chen, 2011].

Una de las variantes más populares de las amplificaciones tipo SDA, es la reacción de hibridación en cadena (HCR) [Dirks, 2004]. El fundamento de esta estrategia (**Figura 18**)

consiste en un sistema de amplificación desencadenado por la presencia de una secuencia iniciadora (I) que origina la apertura transversal de dos sondas adicionales de DNA de tipo horquilla, denominadas convencionalmente H_1 y H_2 , para formar nanofilamentos poliméricos de DNA. Aunque H_1 y H_2 pueden coexistir en un estado metastable en ausencia de I, su presencia provoca la apertura de H_1 mediante su enlace con I, mientras que el dominio de H_1 que queda expuesto interacciona con H_2 , que a su vez contiene una porción de secuencia idéntica a la de I, provocando la apertura de una nueva molécula de H_1 . La sucesión secuencial de estos procesos desencadena una cascada de eventos de hibridación en los que H_1 y H_2 se despliegan consecutivamente para ensamblarse y formar un polímero de DNA de doble cadena de gran longitud [Venkataraman, 2007], [Ciui, 2017].

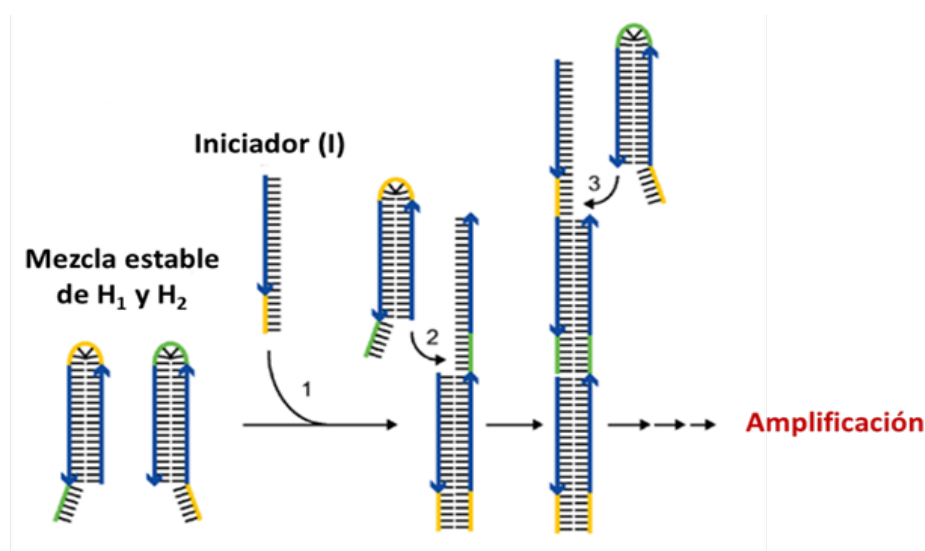


Figura 18: Esquema del mecanismo fundamental de la estrategia de amplificación basada en la reacción de hibridación en cadena (HCR).

A diferencia de la PCR, la HCR es una estrategia de amplificación isoterma que no precisa enzimas y en la que el proceso de amplificación ocurre en las sondas (en este caso H_1 y H_2) y no en la molécula objeto de análisis [Ikbal, 2015], reduciendo, además del coste, la probabilidad de falsos positivos y de contaminación cruzada por parte de los cebadores. Los elementos moleculares cruciales en HCR son las secuencias auxiliares tipo horquilla, H_1 y H_2 , formadas por tres dominios principales: el punto de apoyo (*toehold*), el tallo (*stem*) y el lazo (*loop*), esenciales para el control de la cinética del proceso y almacenamiento de la energía potencial requerida [Dirks, 2004].

La versatilidad de esta estrategia permite su acoplamiento a otras metodologías de amplificación y al empleo de todo tipo de generadores de señal [Chen, 2018^a].

La estrategia RCA se basa en la amplificación de un DNA circular empleado como plantilla o molde, produciendo la síntesis isoterma de una secuencia larga de DNA de cadena sencilla mediada por la enzima DNA polimerasa *phi29* [Han, 2015], [Yu, 2017], [Zhu, 2014]. Esta estrategia, aunque se caracteriza por su elevada sensibilidad, requiere un gran número de etapas y condiciones de almacenamiento especiales para algunos reactivos que intervienen en el proceso [Ciui, 2017].

Por otro lado, la metodología de amplificación HDA amplifica de manera selectiva la secuencia diana mediante la extensión de dos oligonucleótidos cebadores [Cao, 2013]. En HDA se requiere el empleo de la enzima helicasa, encargada de separar las cadenas dobles de DNA, seguida de la extensión del DNA diana por polimerasas, al igual que ocurre en la técnica de PCR, aunque a diferencia de ésta última, la HDA puede emplearse para amplificar RNA mediante su acoplamiento con transcripción reversa [Miao, 2015^a].

Otras de las metodologías que permiten la amplificación de la señal en estrategias para la detección de miRNAs se basan en procesos de regeneración del miRNA de interés empleando nucleasas específicas (DSN) [Wang, 2015^c], [Chen, 2018^a]. Estas metodologías, conocidas también como *estrategias de amplificación cíclica enzimática*, cuentan con la ventaja de que las nucleasas presentan un sitio preferente de ruptura de la secuencia del oligonucleótido correspondiente, lo que desencadena un proceso de reciclamiento del mismo, y proporciona una gran sensibilidad y selectividad [Campuzano, 2017^e].

Además de las comentadas anteriormente, otras variantes de amplificación basadas en ácidos nucleicos y fácilmente trasladables a todo tipo de superficies electrónicas, son la reacción isoterma de la polimerasa con desplazamiento de cadena (ISDPR) [Ma, 2016], amplificación enzimática triple de la polimerasa (3TICA) [Cheng, 2016], amplificación por ensamblaje catalizado de secuencias tipo horquilla (CHA) [Chen, 2018^a] y la amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) [Miao, 2015^a], que también pueden aplicarse de manera individual o acopladas a otros sistemas de amplificación.

Es importante destacar que además de la versatilidad que ofrecen, todas estas metodologías permiten el análisis sensible y selectivo de biomarcadores de diferente nivel

molecular sin necesidad de que la estructura molecular de la diana de interés sufra ningún tipo de alteración como consecuencia de procesos de marcaje y/o etapas de transcripción reversa a cDNA.

La simplicidad de estas estrategias y las excelentes características que imparten a los biosensores electroquímicos, hace que estos dispositivos estén cada vez más cerca de satisfacer las demandas específicas que reclaman los dispositivos portátiles POCT para el análisis descentralizado, rápido, fiable y sensible de cualquier biomarcador, con unas capacidades de rendimiento tan convincentes que harán que la comunidad científica más conservadora sea receptiva para su aceptación en la rutina hospitalaria.

En la **Tabla 6** se resumen las características de algunos de los biosensores electroquímicos más interesantes desarrollados en los últimos 5 años para la determinación sensible de miRNAs, con aplicabilidad real al análisis de muestras clínicas de diversa procedencia, mediante estrategias de amplificación, algunas de ellas combinadas con el empleo de distintos nanomateriales, lo que pone de manifiesto la excelente compatibilidad existente entre nanotecnología y algunas de las estrategias biomoleculares más novedosas ideadas en los últimos años.

Tabla 6: Biosensores electroquímicos para la determinación de miRNAs basados en el empleo de estrategias de amplificación de ácidos nucleicos.

Soporte Transductor Inmovilización	Estrategia	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	Ensayo	LD	Referencia
SH-DNA hairpin SPAuE Interacción SH-DNA y Au	Concatámeros de DNA	miRNA-21	DPV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	Suero humano	[Ru(NH ₃) ₆] ³⁺ (RuHex)	Formación de concatámeros de DNA	100 aM	[Hong, 2013]
Estructura tetraédrica de DNA AuE Interacción SH-DNA y Au	RCA	miRNA-let-7a	LSV	RNA _t de células (A549) y suero	ss-DNA-AgNPs	Amplificación de ss- DNA mediante RCA	50 aM	[Miao, 2015 ^b]
Estructura tetraédrica de DNA AuE Interacción entre SH-DNA y Au	HCR con tetraedros de DNA	hsa-miRNA-17-5p	LSV	Lisados celulares	H ₁ -AgNPs H ₂ -AgNPs	Formación de ds- DNA mediante HCR	2 aM	[Miao, 2015 ^c]
SH-DNA lineal AuE Interacción entre SH-DNA y Au	SDA-TWJ	miRNA-377	DPV (naftilfosfato)	RNA _t de células mesangiales	Estrep-AP	Formación de estructuras de DNA de unión de tres vías modificadas con biotina	0.68 fM	[Hu, 2017]
p19/MBs Quitina MGCE Interacción específica dominio de quitina p19 – MBs Quitina	Concatámeros de DNA	miRNA-21	SWV	Suero humano	DSA	Formación de concatámeros de DNA	6 aM	[Li, 2015 ^c]
Estrep-MBs	Regeneración de miRNA mediante participación de DSN	miRNA-21	EIS (10 kHz – 1 Hz)	Suero humano	---	Regeneración de miRNA-21 mediante acción de DSN específica a dúplex DNA–RNA	60 aM	[Zhang, 2016 ^b]

Tabla 6 (continuación): Biosensores electroquímicos para la determinación de miRNAs basados en el empleo de estrategias de amplificación de ácidos nucleicos.

Soporte Transductor Inmovilización	Estrategia	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	Ensayo	LD	Referencia
GCE/pGO/Au GCE Interacción SH-DNA y Au	CHA	miRNA-155	DPV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	Estudios de recuperación en muestras de suero	Material nanoporoso de TiO ₂ funcionalizado con PtNPs	Regeneración de miRNA-155 mediante CHA y cascada catalítica	0.35 fM	[Wu, 2015 ^b]

Abreviaturas utilizadas: **AgNPs:** nanopartículas de plata; **AP:** fosfatasa alcalina; **Au:** oro; **AuE:** electrodo de oro; **CHA:** ensamblaje catalizado de secuencias tipo horquilla; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **DSA:** 5, 7-dinitro-2-sulfo-acridona; **DSN:** nucleasa específica a dúplex; **EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica; **Estrep:** estreptavidina; **GCE:** electrodo vitrificado de carbono; **H₁:** secuencia tipo horquilla 1; **H₂:** secuencia tipo horquilla 2; **HCR:** reacción de hibridación en cadena; **LSV:** voltamperometría de barrido lineal; **MBs:** partículas magnéticas; **MGCE:** electrodo vitrificado de carbono magnético; **miRNA:** micro-RNA; **pGO:** óxido de grafeno poroso; **PtNPs:** nanopartículas de platino; **p19:** proteína viral p19; **RCA:** amplificación por círculo rodante; **RNA:** RNA total; **SH:** grupo tiol; **SDA-TWJ:** amplificación por desplazamiento de cadena con cruce de tres vías; **SPAuE:** electrodo serigrafiado de oro; **ss-DNA:** DNA de cadena sencilla; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada.

Miao y col. [Miao, 2015^b], [Miao, 2015^c] desarrollaron biosensores electroquímicos para la detección sensible mediante LSV de miRNA-let-7a y hsa-miRNA-17-5p combinando electrodos de oro funcionalizados con nanoestructuras tetraédricas de DNA con estrategias de amplificación por RCA y HCR, respectivamente. Estas estrategias, que empleaban sondas de DNA lineales y de tipo horquilla modificadas con AgNPs para la detección, se aplicaron a la determinación del miRNA diana correspondiente tanto en RNA_t extraído de células y suero, como directamente en lisados celulares.

Es importante mencionar en este punto que las nanoestructuras tetraédricas de DNA empleadas actúan como andamios moleculares que permiten la inmovilización de las sondas de DNA de forma orientada y con el espaciado adecuado para asegurar la máxima eficiencia en el proceso de hibridación [Ge, 2014], [Dong, 2015], [Campuzano, 2017^e].

Otros ejemplos de metodologías para la detección sensible de miRNA-21, son las basadas en la formación de concatámeros de DNA desarrolladas por Hong y col. [Hong, 2013] y Li y col. [Li, 2015^c]. Hong y col., modificaron SPAuEs con sondas de DNA de tipo horquilla tioladas y sondas auxiliares de DNA (AP₁ y AP₂), donde AP₁ presenta una región complementaria al extremo no modificado de la sonda de DNA tipo horquilla y a uno de los extremos de AP₂. En presencia de miRNA-21, se produce un desplegamiento y cambio conformacional de la sonda horquilla que le permite hibridar con AP₁, que a su vez hibrida con AP₂, desencadenando la formación de concatámeros de DNA cargados negativamente y a los que el indicador redox ([Ru(NH₃)₆]³⁺, (RuHex)) se puede enlazar electrostáticamente, obteniéndose una señal en DPV que resulta proporcional a la concentración de miRNA-21. Esta plataforma, que ofrecía un rango lineal comprendido entre 100 aM–100 pM y una excelente selectividad frente a secuencias no complementarias y secuencias con una y dos bases desapareadas, se aplicó al análisis de miRNA-21 en muestras de suero tanto de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama como de individuos control, obteniéndose resultados en concordancia con los proporcionados por qRT-PCR [Hong, 2013].

Por otro lado, el biosensor desarrollado por Li y col., se basa en el ensamblaje de concatámeros de DNA sobre MBs de quitina modificadas con la proteína p19 y en el empleo de una sonda Janus de RNA complementaria a la secuencia del miRNA diana, sondas auxiliares de DNA (AP₁ y AP₂), electrodos de carbono vitrificado provistos de un imán y SWV como técnica electroquímica de detección. La plataforma desarrollada, con un LD de 6 aM, se aplicó

al análisis directo de miRNA-21 en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama, de pulmón y gástrico. La incorporación del compuesto 5, 7-dinitro-2-sulfo-acridona (DSA) como indicador electroquímico, capaz de discriminar inequívocamente entre secuencias de DNA sencillas y dobles, el empleo de MBs convenientemente funcionalizadas con la proteína p19 que permiten el enriquecimiento del miRNA en su superficie, y la formación de largos concatámeros de DNA capaces de albergar en su estructura una enorme cantidad de moléculas de DSA, son los factores principales a los que puede atribuirse la excelente sensibilidad proporcionada por esta metodología [Li, 2015^o].

Por lo tanto, el desarrollo de estrategias capaces de amplificar la señal analítica en condiciones isotermas, basadas en procesos secuenciales de hibridación de ácidos nucleicos y en la formación de superestructuras moleculares que pueden contener grandes cantidades de especies generadoras de la señal y combinarse con el empleo de todo tipo de nanomateriales, abre una nueva y prometedora vía en el campo de la detección ultrasensible y ultraselectiva de biomarcadores de cáncer empleando equipamientos de sencillo manejo, asequibles económicamente y apropiados para su implementación en dispositivos portátiles y automatizables para diagnóstico POC.

2.4. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA MULTIDETERMINACIÓN

A pesar de la gran variedad de metodologías disponibles para la determinación sensible y selectiva de biomarcadores clínicos de diferente nivel molecular, presentes tanto en circulación como en el interior y/o superficie de células y tejidos, hasta la fecha muy pocas o ninguna satisfacen los requerimientos específicos para su aplicación en el diagnóstico clínico real, principalmente debido a la heterogeneidad de enfermedades tan complejas como el cáncer, donde la monitorización de un único biomarcador no aporta la especificidad y sensibilidad suficiente para una detección/pronóstico fiable. Aunque algunos biomarcadores presentan gran sensibilidad de diagnóstico, su falta de especificidad conduce a la obtención de falsos positivos. Así, la evaluación simultánea de paneles de biomarcadores minimiza la obtención de resultados erróneos y permite realizar una caracterización más completa del perfil molecular específico y la etapa de desarrollo en la que se encuentra la neoplasia estudiada [Zheng, 2014], [Agasti, 2012], [Pei, 2012]. Estas plataformas de multiplexado

aseguran la calidad en el diagnóstico *in vitro* de enfermedades y ofrecen tremendas oportunidades en el campo de la medicina personalizada [Dincer, 2017].

Los biosensores electroquímicos también ofrecen grandes posibilidades en este campo [Everson, 2017]. La multidetección sincronizada de diversos analitos empleando biosensores electroquímicos puede realizarse a partir de: un único sistema transductor y sistemas de marcaje múltiple, o plataformas multielectrodo con diversas áreas de sensado [Chikkaveeraiah, 2012], [Pakchin, 2017].

Considerando las proteínas como la forma activa de los genes, el análisis múltiple de este tipo de biomarcadores supone un avance prometedor tanto para la detección temprana del cáncer como para la evaluación de las terapias de seguimiento aplicadas [Ma, 2015]. De igual forma, el análisis de la expresión de múltiples genes en cada biopsia tumoral permite llevar a cabo una clasificación precisa de la neoplasia, definir su origen, mejorar la capacidad pronóstica y, por tanto, seleccionar convenientemente las opciones terapéuticas más eficientes para cada caso particular [Massagué, 2007]. Aunque hasta hace poco tiempo las alteraciones que experimentan las células tumorales se estudiaban una a una en pequeñas series de tumores, las nuevas tecnologías permiten detectar y cuantificar simultáneamente cambios en los niveles de expresión de cientos de miles de genes, estableciendo perfiles moleculares particulares de cada tipo de cáncer [Astudillo de la Vega, 2014].

Por ello, es de esperar que el análisis genómico y proteómico de diferentes enfermedades neoplásicas proporcione un retrato molecular mucho más realista de la enfermedad en tiempo real, lo que resulta determinante para predecir con mucha mayor fiabilidad tanto las respuestas a las terapias aplicadas como la evolución clínica que experimentarán los pacientes.

Las herramientas electroquímicas de multideterminación desarrolladas hasta la fecha se basan generalmente en el empleo de bio-receptores de afinidad y en interacciones Ag–Ab para la multideterminación de biomarcadores proteicos, y en reacciones de hibridación para la determinación de biomarcadores genéticos. En las siguientes secciones se resaltan los aspectos más relevantes de las plataformas electroquímicas desarrolladas recientemente para la multideterminación de biomarcadores del mismo o diferente nivel molecular.

2.4.1. MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE LA MISMA NATURALEZA

Hasta la fecha el desarrollo de las plataformas de multiplexado se ha enfocado fundamentalmente a la determinación de biomarcadores de naturaleza proteica.

A pesar de que la metodología ELISA es uno de los métodos convencionales para la detección de proteínas, además de involucrar protocolos largos y laboriosos, solo permite el análisis de un único analito por ensayo. Por el contrario, las propiedades inherentes a los biosensores electroquímicos pueden trasladarse de forma sencilla a sistemas de multiplexado [Yáñez-Sedeño, 2017].

Aunque se ha demostrado que los biomarcadores de naturaleza genética como DNA y RNA predicen el riesgo de un individuo de padecer cáncer, las proteínas y los metabolitos secretados por las células neoplásicas pueden entenderse como un retrato instantáneo del estado de la enfermedad en los pacientes [Rusling, 2013]. Muchas proteínas son liberadas a circulación en niveles superiores a los normales en el momento en que se inicia el desarrollo del estado patológico, pero presentan un valor predictivo insuficiente, no pudiendo distinguir entre formas agresivas e indolentes de la enfermedad, por lo que los test basados en la determinación de un único biomarcador resultan poco fiables [Rusling, 2010], [Kulasingam, 2008], [Wagner, 2004]. Uno de los principales problemas analíticos asociados a la determinación de biomarcadores proteicos es que los paneles de diagnóstico de biomarcadores en muestras clínicas mínimamente invasivas, como suero, pueden contener algunos de ellos a muy bajas concentraciones y otros a concentraciones mucho más elevadas, en una matriz en la que además están presentes cientos de posibles interferentes [Hanash, 2008].

Generalmente, la detección simultánea de biomarcadores proteicos se basa en formatos tipo sándwich donde el factor clave reside en la obtención de señales independientes para cada analito sobre la misma plataforma sensora. En este punto, una gran variedad de nanomateriales disponibles, con propiedades electroactivas diversas y conjugados a biomoléculas de todo tipo, pueden utilizarse como elementos de señalización en inmunoensayos de multiplexado, siendo los metales nobles y los nanomateriales derivados del carbono los más empleados en el biosensado electroquímico [Wang, 2016^b].

Además de los comentados en apartados anteriores, los mRNAs codificantes para la síntesis de proteínas se consideran biomarcadores capaces de proporcionar información sustancial acerca del progreso evolutivo de la enfermedad, cuya desregulación puede alterar los patrones de metilación del DNA, modificaciones en la cromatina y ciclos celulares, capaces de desencadenar un proceso tumoral [Li, 2015^d], [Topisirovic, 2011]. Aunque estas moléculas representan un pequeño porcentaje del genoma total en comparación con los RNAs no codificantes, el conjunto formado por mRNA, miRNA y lncRNAs presenta un indudable valor diagnóstico y pronóstico en el desarrollo del cáncer, y consecuentemente, existe toda una corriente investigadora dedicada al desarrollo de métodos precisos, robustos y efectivos para el biosensado electroquímico de los mismos [Islam, 2017]. Las metodologías electroquímicas para la detección de RNAs y de biomarcadores de naturaleza genética se basan, en general y como ya se ha comentado, en procesos de hibridación de la secuencia diana de RNA con las secuencias receptoras y complementarias inmovilizadas en la superficie del electrodo [Pöhlmann, 2015], [Hartman, 2013].

La **Tabla 7** recoge algunos de los trabajos más relevantes publicados en los últimos años para la detección multiplexada de biomarcadores proteicos, generalmente empleando configuraciones tipo sándwich y su combinación con estrategias de amplificación mediada por ácidos nucleicos, como HCR. Las superficies empleadas para el desarrollo de los dispositivos de biosensado abarcan MBs funcionalizadas y disponibles comercialmente, nanomateriales derivados del carbono, híbridos nanométricos y otros tipos de estructuras, aplicables al análisis de los biomarcadores seleccionados en cada caso en muestras de suero, plasma y lisados de células, alcanzándose unos LDs comprendidos en el rango de ng mL⁻¹–fg mL⁻¹.

Tabla 7: Biosensores electroquímicos para la determinación multiplexada de biomarcadores de cáncer de naturaleza proteica.

Transductor Soporte	Estrategia	Inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
HOOC-MBs SPdCE	Formato tipo sándwich	Enlace covalente (EDC/NHSS)	ER α PR	Amperometría ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	Lisados celulares (MCF-7 y MDA-MB- 436)	Estrep-HRP	22 pg mL ⁻¹ (PR)	[Eletxigerra, 2016 ^b]
PNIPAAm-Au (P-Au) ITO	Formato tipo sándwich	Enlace de afinidad (Estrep-biotina)	CA125 CEA PSA	Amperometría ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	Suero de pacientes con cáncer de ovario	AbD conjugado a PPyNPs marcadas con HRP (HRP-AbD-Ppy-NPs)	0.007 U mL ⁻¹ (CA125) 0.7 pg mL ⁻¹ (CEA) 0.9 pg mL ⁻¹ (PSA)	[Hong, 2016 ^a]
Epoxy-MBs AuE	Formato tipo sándwich	Interacción epóxido-Ab	EpCAM, CD24, CA125, CD63	Cronoamperometría ($E_{app} = -0.1$ V vs. Ag/AgCl) (TMB)	Plasma	Estrep-HRP	<10 ⁵ exosomas/10 μL muestra	[Jeong, 2016]
Nanoestructura de Polipirrol dopadas con biotina (nano-biotin-Ppy) ITO	Formato tipo sándwich	Enlace de afinidad (Estrep-biotina)	CA125, CEA, PSA	Cronoamperometría ($E_{app} = -0.20$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	Plasma de pacientes con cáncer de ovario	AbD conjugado a PPyNPs marcadas con HRP (HRP-AbD-Ppy-NPs)	0.7 pg mL ⁻¹ (PSA) 0.8 pg mL ⁻¹ (CEA) 0.005 U mL ⁻¹ (CA125)	[Hong, 2016 ^b]
AuNPs SPCE	Formato tipo sándwich	Enlace covalente (EDC/NHSS)	IL-6, IL-8, VEGF, VEGF-C	Amperometría ($E_{app} = -0.3$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ /HQ)	Suero de pacientes con cáncer oral	AbD-MBs-HRP	fg mL ⁻¹	[Malhotra, 2012]
HOOC-MBs Electrodos de película de nano-Au	Formato tipo sándwich	Enlace covalente (EDC/NHSS)	PSA, PSMA, IL-6	CV ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-})	Suero humano	Anticuerpo secundario-HRP conjugado con nanorods de oro (HRP-Ab ₂ -Au NRs)	0.1 ng mL ⁻¹ (PSA) 0.005 ng mL ⁻¹ (IL-6) 0.8 ng mL ⁻¹ (PSMA)	[Liu, 2014 ^a]
Híbrido de grafeno y AuNPs GCE	Formato tipo sándwich con amplificación de la señal por HCR	Interacción Ab-Au	AFP, CEA, CA125, PSA	DPV	Suero humano	Compósitos de Estrep/biotina-ds- DNA/Estrep/biotina- Ab ₂ /Au/SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ modificados con Aq, Fc, Thi y (Co(bpy) ₃) ³⁺ para cada analito	62 fg mL ⁻¹ (AFP) 48 fg mL ⁻¹ (CEA) 77 fg mL ⁻¹ (CA125) 60 fg mL ⁻¹ (PSA)	[Zhu, 2015]

Tabla 7 (continuación): Biosensores electroquímicos para la determinación multiplexada de biomarcadores de cáncer de naturaleza proteica.

Transductor Soporte	Estrategia	Inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
Partículas magnéticas Fe ₃ O ₄ SPCE	Formato tipo sándwich	Enlace covalente (EDC/NHSS)	Fosfo-p53 ¹⁵ y fosfo-p53 ³⁹²	SWV	Estudios de recuperación en muestras de suero	ATCP ó ATLP/SiO ₂ @Au/p53 Ab ₂	0.05 ng mL ⁻¹ (fosfo-p53 ¹⁵) 0.02 ng mL ⁻¹ (fosfo-p53 ³⁹²)	[Ge, 2016]
MPA-AuE Array de electrodos de oro	Formato tipo sándwich	Enlace covalente (EDC/NHSS)	PSA, PSMA, IL-6, PF-4	DPV (H ₂ O ₂ /HQ)	Muestras de suero de pacientes con cáncer de próstata y control sano	Estrep-MBs/biotina-Ab ₂ /biotina-HRP	0.05 – 2 pg mL ⁻¹	[Tang, 2016]

Abreviaturas utilizadas: **Ab**: anticuerpo; **Ab₂**: anticuerpo secundario; **AbD**: anticuerpo de detección; **AFP**: alpha-fetoproteína; **Aq**: antraquinona; **ATCP**: fosfato de cadmio con plantilla de apoferritina; **ATLP**: fosfato de plomo con plantilla de apoferritina; **Au**: oro; **AuNPs**: nanopartículas de oro; **AuNRs**: nanovarillas de oro; **CA125**: antígeno 125; **CEA**: antígeno carcinoembrionario; **CV**: voltamperometría cíclica; **ds-DNA**: DNA de doble cadena; **DPV**: voltamperometría diferencial de impulsos; **E_{app}**: potencial aplicado; **EDC**: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; **EpcAM**: molécula de adhesión epitelial celular; **ERα**: receptor de estrógeno alpha; **Estrep**: estreptavidina; **Fcn**: ferroceno; **GCE**: electrodo vitrificado de carbono; **HCR**: reacción de hibridación en cadena; **HQ**: hidroquinona; **HRP**: peroxidasa de rábano; **IL-6**: interleucina-6; **IL-8**: interleucina-8; **ITO**: óxido de indio y estaño; **LD**: límite de detección; **MBs**: partículas magnéticas; **MPA**: ácido 3-mercaptopropiónico; **NHSS**: N-hidroxisulfosuccinimida; **PF-4**: factor plaquetario 4; **PNIPAAm**: poli (N-isopropil acrilamida); **PPyNPs**: nanopartículas de polipirrol; **PR**: receptor de progesterona; **PSA**: antígeno específico de próstata; **PSMA**: antígeno de membrana específico a próstata; **SPCE**: electrodo serigrafiado de carbono; **SPdCE**: electrodos serigrafiados duales de carbono; **SWV**: voltamperometría de onda cuadrada; **Thi**: tionina; **TMB**: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular; **VEGF-C**: factor de crecimiento endotelial vascular-C.

Eletxigerra y col., desarrollaron una metodología rápida, sencilla y de elevada sensibilidad para la determinación simultánea de dos receptores hormonales de relevancia en el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama: ER α y PR [Eletxigerra, 2016^b]. Mediante la modificación individual de lotes de HOOC-MBs funcionalizadas con anticuerpos específicos a cada uno de los receptores, se lleva a cabo la captura y el reconocimiento específico de cada analito empleando anticuerpos de detección selectivos y conjugados de Estrep-HRP como marcador enzimático, mediante estrategias tipo sándwich, realizando amperometría sobre electrodos serigraviados duales de carbono (SPdCEs) en presencia de HQ y H₂O₂. La sensibilidad de las terapias endocrinas en pacientes con cáncer de mama depende del subtipo molecular de la neoplasia en función del nivel de expresión de ambos receptores, por lo que su determinación simultánea puede predecir el régimen de tratamiento óptimo para cada paciente en particular. Además, PR se comporta como un regulador que controla la actividad transcripcional de la isoforma ER α , con importantes aplicaciones en factores pronósticos e intervenciones terapéuticas de la enfermedad, lo que incrementa la relevancia de la detección simultánea de ambos biomarcadores en la elaboración de diagnósticos más precisos. Con el fin de demostrar la aplicabilidad de esta sencilla metodología, los autores determinaron el contenido endógeno de cada uno de los receptores proteicos en lisados crudos de dos tipos de células de cáncer de mama que expresan distintos niveles de ER α y PR, como las células MCF-7 (con niveles de expresión elevados de ambos receptores) y las células MDA-MB-436 (que presentan niveles de expresión reducidos de ER α y PR).

Por otro lado, Zhu y col., desarrollaron un dispositivo en el que combinan la detección multiplexada con el empleo de estrategias de amplificación basadas en ácidos nucleicos y AuNPs. Sobre electrodos de carbono vitrificado (GCE) codepositan una película híbrida de grafeno y oro (GR-Au) sobre la que inmovilizan anticuerpos de captura específicos a los analitos de interés (AFP, CEA, CA125 y PSA), que son detectados simultáneamente empleando formatos tipo sándwich acoplados a amplificación por HCR, y nanopartículas magnéticas de oro que incrementan la cantidad de moléculas indicadoras de señal. Los anticuerpos secundarios de detección empleados se encuentran conjugados al nanomaterial magnético formando el complejo Estrep/biotina-Ab₂-Au/SiO₂-Fe₃O₄ sobre el que se desencadena el proceso de HCR obteniéndose múltiples unidades del complejo modificados con marcadores electroactivos diferentes para cada analito, a lo largo del híbrido de DNA–DNA formado,

monitorizándose la señal mediante DPV. En este caso los resultados obtenidos demuestran que el acoplamiento con la estrategia de HCR proporciona un incremento en la señal electroquímica de 3.5 veces, alcanzándose LDs del orden de fg mL^{-1} , lo que hace compatible esta metodología con su aplicación a la determinación de estos biomarcadores en muestras de suero [Zhu, 2015].

Por otro lado, Hong y col., propusieron plataformas electroquímicas para la detección de CA125, CEA y PSA. En el primer trabajo describen la fabricación de un inmunosensor basado en un polímero sensible a los cambios de temperatura (PNIPAAm) que permite la regeneración de la superficie sensora para la detección de múltiples biomarcadores sobre electrodos ITO modificados con oro. La estrategia desarrollada, basada en un formato tipo sándwich y el empleo de conjugados de anticuerpos secundarios con nanopartículas de polipirrol y HRP (HRP/Ab/PpyNPs) como elementos detectores capaces de amplificar la señal medida mediante amperometría, permitió obtener LDs de 0.007 U mL^{-1} , 0.7 pg mL^{-1} y 0.9 pg mL^{-1} para CA125, CEA y PSA, respectivamente, y la aplicación de la metodología al análisis de muestras de suero de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario [Hong, 2016^a].

En el segundo trabajo desarrollado por los mismos autores, empleando el mismo formato de ensayo y HRP/Ab/PpyNPs como amplificadores de señal, se llevó a cabo la detección de los mismos marcadores proteicos en muestras de plasma de pacientes con cáncer de ovario, a partir de electrodos ITO sobre los que se electrodepositaba polipirrol dopado con biotina (nano-Ppy) generando una superficie conductora nanorugosa a través de la modulación del potencial eléctrico aplicado, para llevar a cabo la detección electroquímica mediante cronoamperometría [Hong, 2016^b].

La gran variedad de dispositivos electroquímicos disponibles para el multianálisis de biomarcadores proteicos de diagnóstico demuestra, una vez más, las excepcionales propiedades de las metodologías electroquímicas sobre superficies multianálisis, capaces de operar con elevada sensibilidad en todo tipo de matrices biológicas y cumpliendo los criterios clínicos requeridos para el diagnóstico POC.

Atendiendo a los exosomas, vesículas extracelulares que transportan información relevante sobre sus células de origen y contienen, entre otras biomoléculas, una carga proteica cuyos cambios correlacionan con respuestas a tratamientos de enfermedades neoplásicas, Jeong y col., desarrollaron un sistema electroquímico miniaturizado basado en

MBs para la captura y marcaje enzimático de estos biomarcadores [Jeong, 2016]. La plataforma desarrollada presenta 8 superficies electródicas de oro sobre las que se lleva a cabo la detección por cronoamperometría a -0.1 V (vs. electrodo pseudo-referencia de Ag/AgCl), en presencia del sustrato cromogénico TMB, de biomarcadores proteicos relevantes en cáncer de ovario presentes en la superficie de los exosomas, previamente capturados por MBs funcionalizadas con grupos epóxido y modificadas con anticuerpos específicos a CD63 (tetraspanina enriquecida en la superficie de exosomas de pacientes con cáncer de ovario), y por anticuerpos secundarios de detección específicos a las proteínas diana marcados con el conjugado Estrep-HRP. La aplicación clínica de la tecnología desarrollada, con un LD inferior a 10^5 exosomas, se demostró analizando los perfiles de expresión de CD63, EpCAM, CD24 y CA125 en 11 muestras de plasma de pacientes con cáncer de ovario, requiriendo tan solo $10\text{ }\mu\text{L}$ de muestra para cada marcador y 1 hora de ensayo.

En cuanto a los dispositivos electroquímicos para la detección múltiple y simultánea de biomarcadores de nivel genético, tras una revisión bibliográfica, el número de bioplataformas disponibles para tal fin, considerablemente inferior a las descritas para multideterminación de biomarcadores de nivel proteico, no se corresponde con la enorme relevancia clínica ofrecida por los biomarcadores de naturaleza genética. La **Tabla 8** resume los aspectos más importantes de los artículos encontrados para la detección simultánea de uno de los tipos de biomarcadores de mayor utilidad clínica en el progreso de enfermedades neoplásicas, y tema fundamental de esta Tesis Doctoral: los miRNAs.

Tabla 8: Biosensores electroquímicos para la determinación multiplexada de miRNAs.

Transductor Soporte	Estrategia	Inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
AuE-SH-Cp (Hairpin) AuE	Amplificación por regeneración del target asistida por DSN	Interacción SH–Au	miRNA-141 miRNA-21	SWV	Lisados de células de carcinoma de próstata (22Rv1) y de mama (MCF-7)	MB y Fcn	4.2 fM (miRNA-141) 3.0 fM (miRNA-21)	[Yang, 2014]
MBs modificadas con AuNPs (AuNPs-MBs) Electrodo de oro magnético	Hibridación directa (target/SH hairpin-Cp)		miRNA-182 miRNA-381	DPV	Muestras de suero de pacientes con glioma en diferentes etapas	MB y Fcn	0.2 fM (miRNA-182) 0.12 fM (miRNA-381)	[Wang, 2017 ^c]
Ru-SiO ₂ @PLL-Au SPdCE	Hibridación directa (target/SH hairpin-Cp)		miRNA-21 miRNA-141	Electroquimioluminiscencia acoplada a CV	Estudios de recuperación en muestras de suero humano	Fcn-Hairpin DNA1 Fcn-Hairpin DNA2	6.3 fM (miRNA-21) 8.6 fM (miRNA-141)	[Feng, 2016]
AuE modificados con nanoestructuras tetraédricas de DNA SPAuE (x16)	Hibridación tipo sándwich (tetraedro DNA/miRNA/sonda complementaria de detección biotinilada)		miRNA-21 miRNA-155 miRNA-196a miRNA-210	Amperometría ($E_{app} = +0.1$ V vs. Ag/AgCl) (TMB/H ₂ O ₂)	miRNAs extraídos de muestras de suero de pacientes con cáncer de páncreas e individuos sanos	Estrep-poli-HRP40	10 fM	[Zeng, 2017]

Abreviaturas utilizadas: **Au:** oro; **AuE:** electrodo de oro; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **Cp:** sonda de captura; **CV:** voltamperometría cíclica; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **DSN:** nucleasa específica a dúplex; **Estrep:** estreptavidina; **Fcn:** ferroceno; **HRP:** peroxidasa de rábano; **LD:** límite de detección; **MB:** azul de metileno; **MBs:** partículas magnéticas; **miRNA:** micro-RNA; **poli-HRP40:** polímero conteniendo 40 unidades de HRP; **PLL:** poli-L-Lisina; **Ru-SiO₂:** sílica dopada con tris(2,2'-bipyridyl) rutenio (II); **SH:** grupo tiol; **SPAuE:** electrodo serigrafiado de oro; **SPdCE:** electrodos serigrafiados duales de carbono; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

Algunos de los trabajos más recientes en el campo del multianálisis de miRNAs mediante metodologías electroquímicas son los desarrollados por Wang y col., y Zeng y col., basados en ingeniosas estrategias para la determinación en muestras clínicas de individuos diagnosticados con glioblastoma en distintas etapas, y cáncer de páncreas, respectivamente.

Wang y col., desarrollaron una plataforma electroquímica basada en conjugados de MBs recubiertas de nanopartículas de oro (AuNPs-MMBs) y AuNPs modificadas con oligonucleótidos de secuencias cortas ("*diblock*" ODN) funcionalizados con azul de metileno (MB) y ferroceno (Fcn), para la obtención de señales electroquímicas distinguibles correspondientes a miRNA-182 y miRNA-381, respectivamente. Las secuencias "*diblock*", formadas por una región de poli-adeninas (polyA) y una región de reconocimiento hacia el miRNA diana, mejoran y modulan la eficiencia de la hibridación, ya que la adsorción de la región polyA sobre AuNPs presenta una afinidad comparable a la química Au-S, y el conjunto PolyA-AuNPs minimiza las posibles agregaciones inducidas por la salinidad del medio. Además, las regiones de reconocimiento de los *diblock* ODN-AuNPs adoptan una conformación más extendida y erguida en comparación con los ODN tiolados anclados sobre AuNPs, lo que mejora considerablemente la eficiencia de los procesos de hibridación.

Brevemente, el procedimiento experimental llevado a cabo consistió en la preparación de HOOC-MBs cubiertas de AuNPs sobre las que se inmovilizan sondas de DNA tioladas tipo horquilla complementarias a los miRNAs diana, que hibridan con la región del bucle de la secuencia del DNA de captura, permitiendo que la región del DNA libre hibride con el complejo ODN-AuNPs correspondiente modificado con MB o Fcn [Wang, 2017^c]. La transducción electroquímica se realiza mediante DPV sobre SPAuE, y la aplicabilidad de las metodologías, que combinan el incremento en el área superficial y la conductividad gracias a la presencia de AuNPs, las excelentes propiedades de las MBs que favorecen las etapas de lavados a lo largo del ensayo y la minimización del efecto de la matriz de la muestra, y el aumento de la sensibilidad y selectividad mediante los complejos ODN-AuNPs como transductores de la señal, queda demostrada mediante la determinación de los niveles de expresión de ambos oncomiRNAs en muestras de suero de pacientes con glioma en distintas fases de la enfermedad. Los resultados obtenidos confirmaron la hiperexpresión de ambos biomarcadores en este tipo de neoplasia, y un aumento en los niveles de expresión de ambos miRNAs en muestras de suero de pacientes clasificados en estadios III y IV de la enfermedad,

en comparación con los clasificados en estadios I y II, lo que demuestra la validez de este dispositivo para la discriminación entre pacientes con glioblastoma en distintas fases de la enfermedad.

Zeng y col. basaron su metodología en el empleo de sondas de captura de DNA dispuestas de manera tetraédrica, lo que incrementa de manera significativa la sensibilidad de la metodología, para la detección simultánea de miRNA-21, miRNA-155, miRNA-196a y miRNA-210, en extractos de muestras de suero de pacientes con cáncer de páncreas, sobre una plataforma de 16 electrodos serigrafiados de oro. La configuración desarrollada, basada en formatos tipo “sándwich”, consiste en la incubación de cada miRNA con su sonda de detección correspondiente funcionalizada con biotina, y la captura específica del conjunto anterior por la sonda tetraédrica de captura para, finalmente, llevar a cabo el marcaje enzimático del miRNA capturado empleando conjugados de Estrep-poli-HRP40, que cataliza la reducción enzimática del sustrato H_2O_2 en presencia de TMB, mediante amperometría a +0.1 V (vs. electrodo pseudo-referencia de Ag). El análisis de miRNAs circulantes extraídos de muestras de suero de individuos sanos y pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas mediante la metodología propuesta, permitió discriminar entre individuos sanos y enfermos con una sensibilidad que podría satisfacer los estándares requeridos por dispositivos POC [Zeng, 2017].

Así, aunque todavía no existen muchas plataformas que permitan la detección múltiple de diversos miRNAs en un único experimento, las desarrolladas hasta la fecha presentan unas características analíticas y una aplicabilidad real adecuadas para su implementación como dispositivos POC para el análisis multiplexado de biomarcadores, con una sensibilidad y selectividad suficientes para su determinación en biopsias líquidas mínimamente invasivas empleando protocolos relativamente sencillos.

2.4.2. MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISTINTO NIVEL MOLECULAR

La información obtenida a partir del análisis simultáneo de proteínas y genes puede aprovecharse de manera efectiva para el estudio detallado de distintos procesos celulares a distintos niveles moleculares, permitiendo identificar variaciones fenotípicas entre subpoblaciones de células, por ejemplo, explorando todo tipo de respuestas celulares, algo

enormemente útil desde el punto de vista diagnóstico y del diseño de tratamientos personalizados hacia distintas enfermedades [Darmanis, 2016].

Para llevar a cabo la detección de células madre cancerígenas en el interior de un tumor sólido puede ser suficiente el análisis de biomarcadores proteicos, cuya expresión se encuentra elevada en este tipo de células, conociendo *a priori* el tipo de neoplasia. Sin embargo, en otros tipos de muestras como la sangre, donde la disponibilidad de algunos marcadores proteicos celulares puede ser limitada, la detección de otros tipos de biomarcadores (además de los proteicos) puede incrementar de manera notable la sensibilidad, especificidad y eficiencia en la detección de células neoplásicas [Rhee, 2009].

Mientras que el papel de muchos de los biomarcadores proteicos del suero todavía debe ser elucidado con objeto de determinar su utilidad práctica real en el diagnóstico precoz de enfermedades, los biomarcadores circulantes de tipo DNA y RNA, presentan unas características genéticas idénticas a las de los tumores primarios. Así, aunque la mayor parte de las metodologías del campo de los biomarcadores clínicos estén enfocadas a la detección independiente de proteínas y ácidos nucleicos, la determinación combinada de ambos tipos de biomarcadores resulta tremendamente útil para el diagnóstico de enfermedades en las etapas más tempranas de su desarrollo y la estratificación y evaluación de respuestas a las terapias aplicadas, con una sensibilidad y especificidad de diagnóstico mejoradas [Mao, 2014], permitiendo que los especialistas elaboren perfiles o patrones de la enfermedad más precisos en base a la presencia, niveles de expresión y evolución de biomarcadores de distinto nivel, en función del tiempo.

En el caso particular del cáncer de mama, aunque la amplificación del gen *HER-2* y la correspondiente hiperexpresión del receptor HER-2 ocurre en el 15–25 % de los casos, al igual que sucede en otros tipos de neoplasias, este cáncer puede presentar diversos grados de heterogeneidad en cuanto a la expresión y amplificación de receptor y gen, respectivamente [Hirschmann, 2012]. Por ello, la detección simultánea de ambos biomarcadores en un único experimento puede considerarse una herramienta elegante, eficaz y de destacada utilidad para la ejecución de estos tipos de ensayos de rutina por parte de los especialistas.

Una vez más, las excelentes propiedades y características de los biosensores electroquímicos pueden ser aprovechadas para la detección múltiple de biomarcadores de distinto nivel molecular, en un único dispositivo y de una manera rápida y fiable.

Los trabajos encontrados para la detección electroquímica simultánea de proteínas y marcadores genéticos relevantes en el desarrollo de neoplasias y asociados con el progreso y respuesta a tratamientos de las mismas se resumen en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Biosensores electroquímicos para la determinación multiplexada de biomarcadores de cáncer de naturaleza proteica y genética.

Transductor Soporte	Estrategia	Inmovilización	Analito	Técnica de detección	Muestra	Marcador	LD	Referencia
SiNW/APTES/GA-SAM SiNW-FET	Reconocimiento directo DNA/miRNA anti-CEA-Ab/CEA	Enlace covalente entre grupos terminales de DNA y anti-CEA y GA-SAM	CEA miRNA-126	Evaluación de los cambios de corriente en función del tiempo	Suero humano	----	CEA: 1 fg mL ⁻¹ miRNA-126: 0.1 fM	[Gao, 2017]
AuE modificado con CP y NPs de dendrímero modificadas con estreptavidina AuE	Hibridación directa DNA-IL-8 mRNA y formato tipo sándwich para IL-8	Enlace por afinidad (Estrep-biotina)	IL-8 IL-8 mRNA	Amperometría (E _{app} = -0.2 V vs. Au) (TMB/H ₂ O ₂)	Saliva de pacientes con cáncer oral	anti-fluoresceína-HRP anti-IL-8-HRP	IL-8: 7.4 pg mL ⁻¹ IL-8 mRNA: 3.9 fM	[Wei, 2009]
AuE modificados con nanoestructuras de DNA tetraédricas autoensambladas (TDNs) AuE	DNA: Formato tipo sándwich miRNAs: Hibridación del miRNA diana con sonda de captura de tipo horquilla y sonda de detección modificada con biotina Proteínas: Formato tipo sándwich Moléculas pequeñas: Reconocimiento efectivo entre aptámero y molécula diana	Interacción Au-SH	DNAs miRNA-21, miRNA-141 PSA, trombina Cocaína Células	Amperometría (E _{app} = +0.1 V vs. Ag/AgCl) (TMB/H ₂ O ₂)	Lisados celulares, extractos de tejidos y suero humano	Avidina-HRP Estrep-poli-HRP Ab ₂ -HRP	DNA: 1 fM miRNA: 10 aM Moléculas pequeñas: 33 nM Proteínas: 500–1 pg mL ⁻¹ Células: 24 células	[Lin, 2016]

Abreviaturas utilizadas: **Ab**: anticuerpo; **Ab₂**: anticuerpo secundario; **APTES**: 3-aminopropiltriétoxilano; **AuNPs**: nanopartículas de oro; **CEA**: antígeno carcinoembrionario; **Cp**: sonda de captura; **CP**: polímero conductor; **Estrep**: estreptavidina; **FET**: transistor de efecto campo; **GA**: glutaraldehído; **HRP**: peroxidasa de rábano; **IL-8**: interleucina-8; **IL-8 mRNA**: RNA mensajero codificante de la proteína IL-8; **LD**: límite de detección; **miRNA**: micro-RNA; **NPs**: nanopartícula; **PSA**: antígeno específico de próstata; **SAM**: monocapa autoensamblada; **SH**: grupo tiol; **SiNWs**: nanoalambres de silicio; **TMB**: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; **TDNs**: nanoestructuras tetraédricas de DNA autoensambladas.

Wei y col., fabricaron un dispositivo capaz de determinar simultáneamente dos biomarcadores asociados con el desarrollo de cáncer oral en muestras de saliva: la proteína IL-8 y su mRNA correspondiente (IL-8 mRNA), empleando un array de 16 electrodos de oro [Wei, 2009]. Cada unidad transductora se modificaba con un polímero conductor mediante electropolimerización y, con el objetivo de incrementar y mejorar la biocompatibilidad de la película polimérica, la matriz del mismo se modificaba con dendrímeros de nanopartículas modificadas con estreptavidina. Los elementos de reconocimiento selectivos tanto al biomarcador genético (secuencias de tipo horquilla funcionalizadas con biotina y fluoresceína en cada uno de sus extremos) y proteico (anticuerpos), se inmovilizaron sobre la superficie modificada de Au mediante la aplicación de ciclos de potencial a -0.3 V y $+0.2$ V, para, seguidamente, incubar con la muestra que contiene ambos analitos. En presencia de una mezcla de anticuerpos específicos a fluoresceína y a la proteína IL-8 marcados con HRP, se monitoriza la señal amperométrica debida a la presencia de cada biomarcador, en presencia de H_2O_2 y TMB. La aplicabilidad del dispositivo se llevó a cabo mediante el análisis de 56 muestras de saliva, incluyendo 28 muestras de pacientes diagnosticados con cáncer oral y 28 muestras control, demostrándose la presencia de ambas moléculas en las muestras de pacientes con cáncer y, por tanto, su papel como biomarcadores de este tipo de neoplasia. Esta estrategia proporcionó LDs de 3.9 fM y 7.4 pg mL⁻¹ y valores de sensibilidad y especificidad analítica de 83 % y 87 %, y 87 % y 87 %, para la determinación de mRNA y proteína, respectivamente, lo que pone de manifiesto la elevada precisión del método, comparable a las metodologías ELISA y PCR, sin necesidad de llevar a cabo ningún pretratamiento adicional de la muestra, como por ejemplo ciclos de descongelación y procesos de lisis (requeridos en ciertas ocasiones para la liberación de las moléculas de mRNA enlazadas a moléculas de mayor tamaño).

Otro de los trabajos destacables es el desarrollado por Lin y col., que propusieron una plataforma biosensora de carácter universal basada en nanoestructuras tetraédricas de DNA tiolados (TDNs) inmovilizadas sobre la superficie de electrodos de oro con gran reproducibilidad [Lin, 2016]. Estas estructuras tetraédricas, que muestran una excelente versatilidad funcional, pueden emplearse para la detección específica de todo tipo de biomoléculas multinivel mediante amperometría en presencia de H_2O_2 y TMB. Los autores demostraron que la variación del tamaño de las estructuras TDNs permite modular

parámetros cinéticos y termodinámicos del reconocimiento molecular que tiene lugar entre TDNs y las distintas moléculas de interés, mediante la incorporación de toda una variedad de elementos de reconocimiento (DNA, aptámeros y anticuerpos), dispuestos en el vértice superior de la nanoestructura tetraédrica oligonucleotídica, dotando a la metodología de un carácter universal. Aunque la estrategia propuesta se aplicó a la determinación individual de distintos biomarcadores en lisados celulares, extractos tisulares y muestras de suero, no sería descartable su utilización como base fundamental de dispositivos con carácter multianalito para la determinación de un amplio panel de biomarcadores moleculares de manera efectiva, previa modificación de la superficie sensora con la nanoestructura tetraédrica de reconocimiento específica correspondiente.

En conjunto, los trabajos presentados en el último apartado de la Introducción de esta Tesis Doctoral, enfocados a la detección y determinación multiplexada de biomarcadores asociados al desarrollo y evolución de cualquier tipo de enfermedad neoplásica, demuestran la posibilidad de diseñar y fabricar plataformas con aplicabilidad real demostrada para la determinación sensible, selectiva y rápida de biomarcadores de diferente nivel molecular, o con rangos clínicos muy diferentes en muestras clínicas de muy variada naturaleza.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTACIÓN

3.1.1. APARATOS

Para la obtención de las medidas amperométricas se empleó un bipotenciostato CHI812B (CH Instruments, Inc.) controlado por el software CHI812B.

La manipulación, tanto de los RNAs sintéticos como de muestras susceptibles de degradación por RNasas, se llevó a cabo en una cabina de seguridad microbiológica de flujo laminar Telstar BioSTAR (mod. AH-100), y la esterilización (a 121 °C y 1 atm de presión) del material de laboratorio necesario y de las disoluciones reguladoras requeridas para la preparación de biosensores que emplean este tipo de oligonucleótidos se ha realizado en un autoclave Trade Raypa®.

Las etapas de modificación, separación y lavados de los diferentes tipos de partículas micromagnéticas (MBs) empleadas como soportes para el desarrollo de los distintos biosensores se han realizado en un incubador provisto de un sistema de control de la temperatura y agitación, Optic Ivymen® System (Comecta S.A, Scharlab), y con la ayuda de un concentrador magnético DynaMag™ -2 (producto nº. 123.21D, Invitrogen Dynal AS) (Figura 19), respectivamente.



Figura 19: Concentrador magnético empleado para las etapas de modificación de las MBs.

Otros aparatos utilizados:

- pH-metro de precisión Crison Basic 20+, calibrado de forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 4.00, 7.00 y 9.21 a una temperatura de (25 ± 0.5) °C.
- Agitador magnético MS01 (Elmi Ltd.).
- Termociclador (SensoQuest LabCycler, Progen Scientific Ltd.).

- Agitador de tubos AGT-9 (Bunsen).
- Dispositivo para la recolección de muestras de saliva, Salivette® (Sarstedt).
- Centrífuga MPW-65R.

3.1.2. ELECTRODOS, CONECTORES Y CARCASAS

Los transductores electroquímicos empleados se muestran en la **Figura 20a y 20b**.

- Electrodo serigrafado individual de carbono (SPCEs) (DRP-110, $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm, $\phi = 4$ mm, $A = 12.56$ mm², DropSens®) que contienen un electrodo de trabajo de carbono, un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag, impresos en su superficie.
- Electrodo serigrafado dual de carbono (SPdCEs) (DRP-C1110, $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm, DropSens®), que contienen dos electrodos de trabajo elípticos ($\phi = 6.3$ mm²), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag, impresos en su superficie.
- Cables conectores para electrodos serigrafados individuales (SPCE) (Ref. CAC) y duales (SPdCE) (Ref. BICAC).
- Carcasas de teflón de fabricación casera provistas de uno o dos imanes de neodimio (AIMAN GZ) para la captura controlada y reproducible de las MBs modificadas sobre los SPCE y SPdCE, respectivamente (**Figura 20c**).

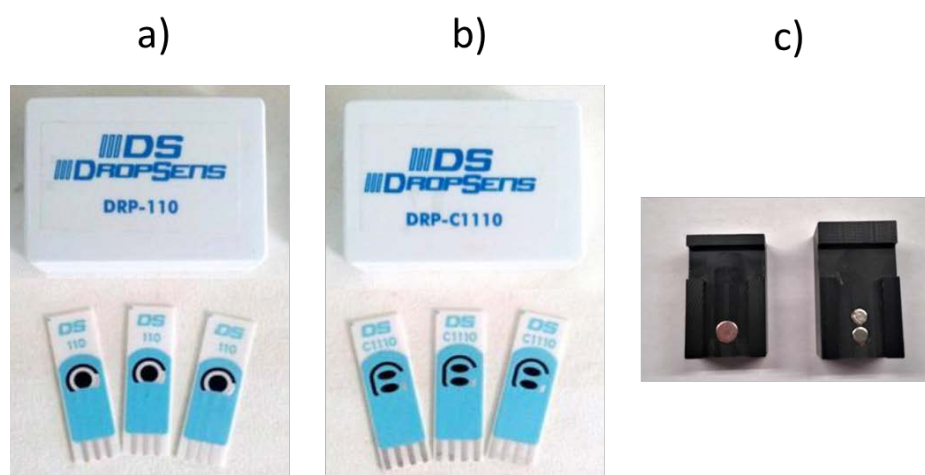


Figura 20: Electrodo serigrafado de carbono empleados para detección individual (SPCE) (a) y dual (SPdCE) (b) y carcasas de teflón empleadas para la captura magnética de las MBs sobre la superficie de los SPCEs y SPdCEs (c).

3.2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

3.2.1. REACTIVOS

Los diferentes reactivos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral, clasificados a continuación según su uso, fueron en todos los casos de calidad para análisis:

- Reactivos necesarios para la preparación de disoluciones reguladoras:
 - Fosfato monosódico dihidratado, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99 %, Scharlau).
 - Fosfato disódico anhidro, Na_2HPO_4 (99 %, Scharlau).
 - Cloruro de sodio, NaCl (99.8 %, Scharlau).
 - Clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano, Tris-HCl (99 % Scharlau).
 - Citrato de sodio, $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich).
 - Sal disódica del ácido etilendiaminotetracético, EDTA (Merck).
 - Cloruro de potasio, KCl (Scharlau).
 - Tween® 20 (Sigma-Aldrich).
 - Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, MES (Gerbú).
 - Albúmina de suero bovino, BSA (BSA-TYPE VH, 1066.0010, Gerbú).
 - Tris (2-carboxietil) clorhidrato de fosfina, TCEP (Sigma-Aldrich).

- Partículas micromagnéticas comerciales modificadas (MBs):
 - Partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (Estrep-MBs), (Dynabeads® M-280 Streptavidin, $2.8 \mu\text{m}$ \varnothing , 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
 - Partículas magnéticas modificadas con grupos carboxílicos (HOOC-MBs), (Dynabeads® M270 Carboxylic Acid, $2.8 \mu\text{m}$ \varnothing , 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
 - Partículas magnéticas modificadas con HaloTag (HaloTag-MBs), (HaloTag MBs, $50\text{--}80 \mu\text{m}$ \varnothing , MBs Magne HaloTag beads, Cat. No: G7281, Promega Biotech Ibérica).
 - Partículas magnéticas modificadas con quitina (Quitina-MBs), (Chitin-MBs, $50\text{--}70 \mu\text{m}$ \varnothing , E8036S, New England Biolabs).
 - Partículas magnéticas modificadas con proteína G (ProtG-MBs) (Dynabeads® Protein G, $2.8 \mu\text{m}$ \varnothing , 30 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).

- Reactivos empleados en la activación y bloqueo de las MBs:
 - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC (Acros Organics).
 - N-hidroxisulfosuccinimida, Sulfo-NHS (Sigma-Aldrich).
 - Etanolamina (Sigma-Aldrich®).
 - Disolución bloqueante comercial de PBS suplementada con caseína al 1 % (p/v), (Thermo Scientific Cat. No: 37528, Waltham, MA, USA).
 - Leche desnatada en polvo.
- Reactivos empleados para llevar a cabo la detección amperométrica:
 - Hidroquinona, HQ (99+ %, Sigma-Aldrich).
 - Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (30 % (p/p) en H₂O (Sigma-Aldrich)).
- Anticuerpos:
 - Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con HRP específico de Fibrinógeno humano, *anti-Fbg-HRP* (HyTest Ltd).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón específico de CD105 humana, *anti-CD105* (ref. SEK10149-5, Sino Biological Inc., China).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con HRP específico de CD105 humana, *anti-CD105-HRP* (ref. SEK10149-5, Sino Biological Inc., China).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón específico de FGFR4 humana, *anti-FGFR4* (ref. DY685-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).
 - Anticuerpo biotinilado de rata específico de FGFR4 humana, biotin-anti-FGFR4, *b-anti-FGFR4* (ref. DY685-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).
 - Anticuerpo monoclonal de conejo específico de HER-2 humana, *anti-HER-2* (ref. SEKA10004, Sino Biological Inc, China).
 - Anticuerpo monoclonal de conejo conjugado con HRP específico de HER-2 humana, *anti-HER-2-HRP* (ref. SEKA10004, Sino Biological Inc, China).
 - Anticuerpo conjugado a HRP específico de inmunoglobulina G humana, *anti-IgG-HRP* (Dako).
 - Calibrador estándar (suero humano diluido con una concentración de autoanticuerpos frente a p53 humana de 10 U mL⁻¹) (componente del Kit ELISA

comercial para la determinación de autoanticuerpos frente a p53 humana en muestras de suero, Dianova GmbH, Hamburg, Germany).

- Anticuerpo específico del tag Halo, *anti-HaloTag* (Promega).
 - Anticuerpo específico de la proteína recombinante p53 humana, *anti-p53* (BD).
 - Anticuerpo específico de la proteína recombinante p73 humana, *anti-p73* (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a HRP específico del dominio de unión a maltosa (MBD), *anti-MBP-HRP* (New England Biolabs).
 - Anticuerpo monoclonal de ratón específico de heterohíbridos de DNA–RNA, *Ab S9.6* (Kerafast, Boston, MA, USA).
 - Anticuerpo de captura específico de IL-8 humana, *anti-IL-8* (B-K8, Abcam).
 - Anticuerpo biotinilado específico de IL-8 humana, *b-anti-IL-8* (biotinylated Poly anti-IL-8, Abcam).
- Antígenos y proteínas recombinantes:
- Fibrinógeno humano, *Fbg* (Abcam).
 - Fibrinógeno humano conjugado con biotina, *biotin-Fbg* (biotinilado mediante EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) según especificaciones).
 - Endoglina humana recombinante, *CD105* (ref. SEK10149-5, Sino Biological Inc., China).
 - FGFR4 humana recombinante, *FGFR4* (ref. DYC685-2, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).
 - HER-2 humana recombinante, *HER-2* (ref. SEKA10004, Sino Biological Inc, China).
 - Proteína p19 de unión a siRNA del virus Carnation Italian Ringspot (CIRV) con afinidad específica a homohíbridos RNA–RNA, clonada y expresada en *Escherichia coli*, con un dominio de unión a maltosa (MBD) en el extremo N_t y otro de unión a quitina (CBD) en el extremo C_t. Se suministra en una disolución que contiene 10 U μL^{-1} de p19 en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA y 50 % de glicerol, *p19* (New England Biolabs).
 - IL-8 humana, *IL-8* (Eli Standard, Abcam).

- Secuencias de oligonucleótidos:

Las secuencias sintéticas de DNA y RNA empleadas (todas suministradas por Sigma-Aldrich) se muestran en las **Tablas 10 y 11**. Todas se reconstituyeron en el volumen adecuado de agua esterilizada libre de RNasas o en disolución reguladora TE (pH 8.0) (solo las indicadas con *) para obtener una concentración final correspondiente a 100 μ M y se almacenaron en alícuotas de pequeño volumen (5.0 μ L) a -80°C .

Tabla 10: Secuencias sintéticas de DNA empleadas en esta Tesis Doctoral.

Descripción de oligonucleótido (nomenclatura en texto)	Secuencia (5' → 3')
Sonda de captura biotinilada complementaria a miRNA-205 (b-anti-DNA-205)	5'-AGACTCCGGTGAATGAAGGA-Biotin-3'
Sonda de captura complementaria a miRNA-205 (anti-DNA-205)	5'-AGACTCCGGTGAATGAAGGA-3'
Sonda de captura biotinilada complementaria a miRNA-21 (b-anti-DNA-21)	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-Biotin-3'
Sonda de captura biotinilada complementaria a miRNA-223 (b-anti-DNA-223)	5'-AACTCAGCTTGTCAAATACACG-Biotin-3'
Sonda de captura biotinilada complementaria a miRNA-155 (b-anti-DNA-155)	5'-ACCCCTATCACAATTAGCATTAA-Biotin-3'
Sonda de captura lineal biotinilada complementaria a miRNA-21 (b-Cp)	5'-CTGATAAGCTAGCCGG-Biotin-3'
*Sonda de captura tipo horquilla biotinilada complementaria a miRNA-21 (b-HCp)	5'-Biotin-GGCCGTC AACATCAGTCTGATAAGCTAAACATGATGACGGCC-3'
Sonda de detección complementaria a miRNA-21 (Dp)	5'-AGTCTAGGATTCGGCGTGGGTAAATCAACATCAGT-3'
Sonda de detección complementaria a miRNA-21 (S ₀)	5'-AGTCTAGGATTCGGCGTGGGTAAAGGCCGTCATCAT-3'
*Sonda biotinilada tipo horquilla (b-H ₁)	5'-Biotin-TTAACCCACGCCGAATCCTAGACTCAAAGTAGTCTAGGATTCGGCGTG-3'
*Sonda biotinilada tipo horquilla (b-H ₂)	5'-Biotin-AGTCTAGGATTCGGCGTGGGTAAACACGCCGAATCCTAGACTACTTTG-3'
*Sonda biotinilada tipo horquilla complementaria a IL-8 mRNA (b-HCp-IL-8)	5'-Biotin-GAGGGTTGCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTCCACAACCCTC-3'
*Sonda diana IL-8 mRNA biotinilada (b-IL-8 mRNA)	5'-Biotin-GAGGGTTGTGGAGAAGTTTTGAAGAGGGCTGAGCAACCCTC-3'
*Sonda diana IL-8 mRNA biotinilada con una base desapareada (1-m)	5'-Biotin-GAGGGTTGTGGAGAAGTTTTGAAGAGGTCTGAGCAACCCTC-3'
*Sonda diana no complementaria a b-HCp-IL-8 mRNA (NC)	5'-Biotin-GATAGCAGAAGTGGACCGGTCCTGTAATGTCTAGCAATGT-3'

* Reconstituidas en disolución reguladora TE (pH 8.0)

Tabla 11: Secuencias sintéticas de RNA empleadas en esta Tesis Doctoral.

Descripción de oligonucleótido (nomenclatura en texto)	Secuencia (5' → 3')
Sonda de detección biotinilada complementaria a miRNA-21 fosforilada en 5' (biotin-anti-miRNA-21)	5'-Phos-ACAUCAGUCUGAUAGCUA-Biotin-3'
Sonda de detección biotinilada complementaria a miRNA-205 fosforilada en 5' (biotin-anti-miRNA-205)	5'-Phos-AGACUCCGGUGGAAUGAAGGA-Biotin-3'
Sonda diana miRNA-21 fosforilada en 5' (miRNA-21)	5'-Phos-UAGCUUAUCAGACUGAUGU-3'
Sonda diana miRNA-205 fosforilada en 5' (miRNA-205)	5'-Phos-UCCUUCAUCCACCGGAGUCU-3'
Sonda diana miRNA-21 fosforilada en 5' con una base central desapareada (miRNA-21 1-m)	5'-Phos-UAGCUUAU <u>A</u> AGACUGAUGU-3'
Sonda diana miRNA-205 fosforilada en 5' con una base central desapareada (miRNA-205 1-m)	5'-Phos-UCCUUCAUU <u>A</u> CACCGGAGUCU-3'
Sonda diana miRNA-192 fosforilada en 5' (miRNA-192)	5'-Phos-CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3'
Sonda de captura biotinilada complementaria a miRNA-205 (b-anti-RNA-205)	5'-AGACUCCGGUGGAAUGAAGGA-Biotin-3'
Sonda diana miRNA-205 (miRNA-205)	5'-UCCUUCAUCCACCGGAGUCU-3'
Sonda diana miRNA-21 (miRNA-21)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
Sonda diana miRNA-223 (miRNA-223)	5'-CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU-3'
Sonda diana miRNA-155 (miRNA-155)	5'-UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU-3'
Sonda diana miRNA-205 con una base central desapareada (miRNA-205 1-m)	5'-UCCUUCAUU <u>A</u> CACCGGAGUCU-3'
Sonda diana miRNA-192 (miRNA-192)	5'-CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3'
Sonda diana miRNA-21 con una base central desapareada (1-m(c) o 1-mcp)	5'-UAGCUUAUCA <u>A</u> ACUGAUGUUGA-3'
Sonda diana miRNA-21 con una base terminal desapareada (1-m(t) o 1-mdp)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG <u>G</u> -3'

▪ Otros reactivos empleados:

Marcajes enzimáticos: conjugado ultrasensible de estreptavidina-peroxidasa de rábano, *Estrep-HRP* (Ref: 11 089153 001, 500 U mL⁻¹, Roche); proteína A conjugada con HRP, *ProtA-HRP* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); proteína A conjugada con un homopolímero de 40 unidades de HRP, *ProtA-poli-HRP40* (Antibodies-online, Catalog No.: ABIN929490).

Interferentes ensayados en los inmunosensores desarrollados: heparina (sal sódica de la mucosa intestinal porcina) (H3149, Sigma-Aldrich), hemoglobina humana (H7379, Sigma-Aldrich), IgG procedente de suero humano (I2511, Sigma-Aldrich), dímero-D (D-dimer, Cat. ab35949, Abcam), albúmina de suero bovino (BSA-TYPE IV, 1066.0010, Gerbu), receptor humano recombinante de progesterona, PR (ref. DYC5415, R&D Systems Inc.), receptor humano recombinante de estrógeno tipo α , ER α (ref. DYC5715, R&D Systems Inc.), proteína humana recombinante TNF- α (ref. IM1121, Immunotech), proteína humana recombinante p53 fusionada a glutathion S-transferasa (GST) en su extremo N_t, GST-p53 (Catalog#14-865, EMD Millipore Corporation), albúmina de suero humano, HSA (ref. 009-000-051, Jackson ImmunoResearch), lactoperoxidasa de leche bovina, LPO (Sigma-Aldrich), IL-6 (K130627, Abcam).

Síntesis y evaluación de las propiedades catalíticas de nanopartículas de Azul de Prusia (PBNPs) y sus análogos estructurales de Cu (CuFe NPs), Co (FeCo NPs) y Fe-Co (FeCoFe NPs): ácido cítrico, HOC(COOH)(CH₂COOH)₂ (99.5 %, Sigma-Aldrich), cloruro de hierro (III), FeCl₃ (97 %, Sigma-Aldrich), cloruro de hierro (II), FeCl₂ (98 %, Sigma-Aldrich), ferricianuro potásico, K₃[Fe(CN)₆] (99 %, Sigma-Aldrich), ferrocianuro potásico, K₄[Fe(CN)₆] 3 H₂O (98.5–102.2 %, Sigma-Aldrich), cloruro de cobalto (II), CoCl₂ (98 %, Sigma-Aldrich), cloruro de cobre (II), CuCl₂ (99 %, Sigma-Aldrich), acetato de cobalto (II), Co(OAc)₂ (99.995 %, Sigma-Aldrich), luminol, C₈H₇N₃O₂ (97 %, Sigma-Aldrich), dopamina, (HO)₂C₆H₃CH₂CH₂NH₂·HCl (Sigma-Aldrich), dinucleótido de nicotinamida y adenina, NADH, C₂₁H₂₇N₇Na₂O₁₄P₂ H₂O (97 %, Sigma-Aldrich), D-(+)-glucosa, C₆H₁₂O₆ (Sigma-Aldrich), glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* Type X-S, GOx (Sigma-Aldrich), alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, AlcDH (Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio, MgCl₂ (98 %, Sigma-Aldrich).

3.2.2. DISOLUCIONES

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q. Los procedimientos empleados para la preparación de las distintas disoluciones, agrupadas según su uso, se indican a continuación:

Disoluciones reguladoras:

- *Disolución reguladora de fosfato 1 M*: se prepara disolviendo 8.4 g de Na_2HPO_4 y 112.9 g de NaH_2PO_4 en 1.0 L de agua desionizada.
- *Disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0)*: se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1 M, ajustando posteriormente el pH a 6.0.
- *Disolución reguladora de Binding and Washing (B&W) 0.01 M (pH 7.5)*: preparada disolviendo las cantidades necesarias de cada uno de los componentes en agua desionizada para que la composición final sea 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 2 M de NaCl y ajustando posteriormente el pH a 7.5. En caso necesario esta disolución se esterilizaba a 121 °C y 1 atmósfera de presión tras su preparación.
- *Disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.5)*: se prepara una disolución reguladora de fosfato 10 mM conteniendo 137 mM de NaCl y 2.7 mM de KCl, ajustando posteriormente el pH a 7.5. En caso necesario esta disolución se esterilizaba a 121 °C y 1 atmósfera de presión tras su preparación.
- *Disolución reguladora de PBS NaCl 0.01 M (pH 7.5)*: se prepara una disolución reguladora de fosfato 10 mM conteniendo 1 M de NaCl y 2.7 mM de KCl, ajustando posteriormente el pH a 7.5.
- *Disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5)*: se prepara una disolución de PBS 10 mM (pH 7.5) conteniendo 0.05 % (v/v) de Tween® 20.
- *Disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5) y 0.05 % (v/v) Tritón*: se prepara una disolución de PBS 10 mM (pH 7.5) conteniendo 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y 0.05 % de Tritón (v/v).
- *Disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5) suplementada con leche desnatada en polvo*: se prepara una disolución de PBS 10 mM (pH 7.5) conteniendo 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y leche desnatada en polvo al 3 % (p/v).

- *Disolución reguladora de MES 0.025 M (pH 5.0)*: se prepara disolviendo 1.22 g del reactivo comercial en 250 mL de agua desionizada, ajustando posteriormente el pH a 5.0.
- *Disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0)*: se prepara disolviendo 0.613 g de Na_2HPO_4 y 0.095 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua desionizada, ajustando posteriormente el pH a 8.0.
- *Disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2)*: se prepara disolviendo 0.788 g del reactivo comercial en 50 mL de agua desionizada, ajustando posteriormente el pH a 7.2.
- *Disolución reguladora 10 \times p19 Binding Buffer (pH 7.0)*: se prepara disolviendo las cantidades necesarias de cada uno de los componentes en agua esterilizada para que la composición final sea 200 mM Tris-HCl, 1 M de NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM TCEP y 0.2 % (v/v) de Tween® 20, ajustando posteriormente el pH a 7.0.
- *Disolución reguladora de 1 \times p19 Binding Buffer (pH 7.0)*: se prepara por dilución de la disolución reguladora 10 \times p19 Binding Buffer en agua esterilizada.
- *Disolución reguladora de lavado 1 \times Wash Buffer (pH 7.0)*: se prepara disolviendo las cantidades necesarias de cada uno de los componentes en agua esterilizada para que la composición final sea 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA, ajustando posteriormente el pH a 7.0.
- *Disolución reguladora de citrato de sodio salino (SSC) (pH 7.4)*: preparada disolviendo 1.935 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y 4.383 g de NaCl en 250 mL de agua desionizada para que la composición final sea 30 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y 300 mM NaCl, ajustando posteriormente el pH a 7.4. Esta disolución se esterilizó a 121 °C y 1 atmósfera de presión tras su preparación.
- *Disolución reguladora Tris-EDTA (TE) (pH 8.0)*: preparada disolviendo 0.394 g de Tris-HCl y 0.07306 g de EDTA en 250 mL de agua desionizada para que la composición final sea 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, ajustando posteriormente el pH a 8.0.

El ajuste del pH final de cada disolución se realizó empleando HCl o NaOH 2 M.

Disoluciones de anticuerpos y antígenos:

- *Disolución de biotin-Fbg* $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de biotin-Fbg ($7800 \mu\text{g mL}^{-1}$) en B&W 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de Fbg + anti-Fbg-HRP* $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones comerciales de Fbg ($2300 \mu\text{g mL}^{-1}$) y anti-Fbg-HRP ($900 \mu\text{g mL}^{-1}$) en PBS NaCl 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de anti-CD105* $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-CD105 ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) en MES 0.025 M (pH 5.0).
- *Disolución de CD105* 250 ng mL^{-1} : se reconstituyen 120 ng del reactivo comercial en 480 μL de PBS 0.01 M filtrado (pH 7.5).
- *Disolución de CD105 + anti-CD105-HRP* $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones comerciales de CD105 (250 ng mL^{-1}) y anti-CD105-HRP ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v).
- *Disolución de anti-FGFR4* $180 \mu\text{g mL}^{-1}$: se reconstituyen 36 μg del reactivo comercial en 200 μL de PBS 0.01 M filtrado (pH 7.5).
- *Disolución de anti-FGFR4* $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-FGFR4 ($180 \mu\text{g mL}^{-1}$) en MES 0.025 M (pH 5.0).
- *Disolución de FGFR4* 90 ng mL^{-1} : se reconstituyen 45 ng del reactivo comercial en 500 μL de TE filtrado (pH 8.0).
- *Disolución de b-anti-FGFR4* $28.8 \mu\text{g mL}^{-1}$: se reconstituyen 28.8 μg del reactivo comercial en 1 mL de PBS 0.01 M filtrado (pH 7.5).
- *Disolución de FGFR4 + b-anti-FGFR* $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ + Estrep-HRP (1:1000): se prepara por dilución adecuada de las disoluciones preparadas de FGFR4 (90 ng mL^{-1}) y b-anti-FGFR4 ($28.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) y de la comercial de Estrep-HRP (500 U mL^{-1}), en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v).
- *Disolución de anti-HER-2* $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-HER-2 ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) en MES 0.025 M (pH 5.0).
- *Disolución de HER-2* 125 ng mL^{-1} : se reconstituyen 24 ng del reactivo comercial en 192 μL de PBS 0.01 M filtrado (pH 7.5).

- *Disolución de HER-2 + anti-HER-2-HRP 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara por dilución adecuada de la disolución preparada de HER-2 (125 ng mL⁻¹) y de la comercial de anti-HER-2-HRP (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en PBST 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de autoanticuerpos frente a p53*: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial del calibrador estándar (10 U mL⁻¹) en PBS 0.01 M suplementada con 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y 3 % (p/v) de leche desnatada en polvo.
- *Disolución de anti-IgG-HRP (1:600)*: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-IgG-HRP en PBS 0.01 M suplementada con 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y 3 % (p/v) de leche desnatada en polvo.
- *Disolución de anti-MBP-HRP (1:1000)*: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-MBP-HRP (1.0 mg mL⁻¹) en 1×Wash Buffer (pH 7.5).
- *Disolución de Ab S9.6 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de Ab S9.6 (2.0 mg mL⁻¹) en PBS 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de anti-IL-8 (1:20)*: preparada por dilución adecuada de la disolución comercial de anti-IL-8 en MES 0.025 M (pH 5.0).
- *Disolución de IL-8 10000 pg mL⁻¹*: se reconstituyen los 1860 pg suministrados del reactivo comercial en 186 μL de PBST 0.01 M filtrado (pH 7.5).
- *Disolución de b-anti-IL-8*: se reconstituye el contenido del reactivo comercial en 550 μL de PBST 0.01 M filtrado (pH 7.5).
- *Disolución de b-anti-IL-8 (1:10)*: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de b-anti-IL-8 en PBST 0.01 M (pH 7.5).

Disoluciones de DNAs y RNAs sintéticos:

- *Disolución de miRNA + 0.01 μM biotin-anti-miRNA-21*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas del miRNA correspondiente (100 μM) y de biotin-anti-miRNA-21 (100 μM) en 1×p19 Binding Buffer (pH 7.0).
- *Disolución de miRNA + 0.01 μM biotin-anti-miRNA-205*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas del miRNA correspondiente (100 μM) y de biotin-anti-miRNA-205 (100 μM) en 1×p19 Binding Buffer (pH 7.0).

- *Disolución de miRNA + 0.1 μ M biotin-anti-miRNA-21*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas del miRNA correspondiente (100 μ M) y de biotin-anti-miRNA-21 (100 μ M) en 1 \times p19 Binding Buffer (pH 7.0).
- *Disolución de miRNA + 0.05 μ M b-anti-DNA-205*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas del miRNA correspondiente (100 μ M) y de b-anti-DNA-205 (100 μ M) en PBS esterilizado 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de miRNA-21 + 0.05 μ M b-anti-DNA-21*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas de miRNA-21 (100 μ M) y de b-anti-DNA-21 (100 μ M) en PBS esterilizado 0.01 M (pH 7.5).
- *Disolución de b-anti-DNA-21 0.1 μ M*: se prepara por dilución adecuada de la disolución sintética reconstituida de b-anti-DNA-21 (100 μ M) en B&W esterilizado (pH 7.5).
- *Disolución de b-Cp 2.0 μ M*: se prepara por dilución adecuada de la disolución sintética reconstituida de b-Cp (100 μ M) en B&W esterilizado (pH 7.5).
- *Disolución de b-HCp 2.0 μ M*: se prepara por dilución adecuada de la disolución sintética reconstituida de b-HCp (100 μ M) en B&W esterilizado (pH 7.5).
- *Disolución de miRNA+ 0.25 μ M Dp + 0.5 μ M b-H₁ + 0.5 μ M b-H₂*: se prepara por dilución adecuada de las disoluciones sintéticas reconstituidas del miRNA correspondiente (100 μ M), Dp (100 μ M), b-H₁ (100 μ M) y b-H₂ (100 μ M) en SSC esterilizado (pH 7.4).
- *Disolución de b-HCp-IL-8 0.5 μ M*: se prepara por dilución adecuada de la disolución sintética reconstituida de b-HCp-IL-8 (100 μ M) en B&W (pH 7.5).
- *Disolución de b-IL-8 mRNA, y secuencias de b-IL-8 mRNA (1-m) o (NC)*: se prepara por dilución adecuada de la disolución sintética reconstituida de la secuencia correspondiente (100 μ M) en PBST (pH 7.5).

Disoluciones de marcadores enzimáticos, mediador electroquímico y sustrato enzimático:

- *Disolución de Estrep-HRP (1:1000)*: se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), 1×Wash Buffer (pH 7.5) o en PBST (pH 7.5), dependiendo del ensayo.
- *Disolución de Estrep-HRP (1:2500) y (1:25000)*: se preparan por dilución adecuada de la disolución comercial en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v).
- *Disolución de ProtA-poli-HRP40 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara por dilución adecuada de la disolución comercial de ProtA-poli-HRP40 (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) suplementada con las concentraciones adecuadas de Ab S9.6 y del miRNA correspondiente.
- *Disolución de HQ 0.1 M*: se prepara justo antes de realizar la medida amperométrica disolviendo 11 mg de HQ en 1 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).
- *Disolución de H_2O_2 0.1 M*: se prepara en el momento de uso diluyendo 51 μL del reactivo comercial (H_2O_2 , 30 % p/p) en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

Otras disoluciones:

Interferentes empleados en los inmunosensores desarrollados:

- *Disolución de heparina 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara una disolución de heparina 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo 6.0 mg del reactivo comercial en 1 mL de PBS NaCl. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior en el medio correspondiente.
- *Disolución de hemoglobina de 5.0 mg mL^{-1} y 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara una disolución de hemoglobina de 250 mg mL^{-1} disolviendo 250 mg del reactivo comercial en 1 mL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) o PBS NaCl, respectivamente. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior en el medio correspondiente.
- *Disolución de IgG procedente de suero humano de 1.0 mg mL^{-1} , 37.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 11.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$* : se prepara una disolución de IgG humana de 5.0 mg mL^{-1} disolviendo 5.0

mg del reactivo comercial en 1 mL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), PBS NaCl 0.01 M (pH 7.4) o PBST 0.01 M (pH 7.5), respectivamente. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de las disoluciones anteriores en el medio correspondiente.

- *Disolución de BSA* 54 mg mL^{-1} , 50 mg mL^{-1} y 5.0 mg mL^{-1} : se prepara una disolución de BSA de 250 mg mL^{-1} disolviendo 250 mg del reactivo en 1 mL de PBS NaCl 0.01 M (pH 7.4), PBST 0.01 M (pH 7.5) o disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), respectivamente. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de las disoluciones anteriores en el medio correspondiente.
- *Disolución de EDTA* 1.0 mg mL^{-1} y 3.0 mM (0.87 mg mL^{-1}): se prepara una disolución de 5.0 mg mL^{-1} de EDTA disolviendo 5.0 mg del reactivo en 1 mL de PBS NaCl 0.01 M (pH 7.4) o PBST 0.01 M (pH 7.5), respectivamente. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de las disoluciones anteriores en el medio correspondiente.
- *Disolución de HSA* $5.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara una disolución de HSA de 10.0 mg mL^{-1} disolviendo 10.0 mg del reactivo en 1 mL de PBST 0.01 M (pH 7.5). Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de las disoluciones anteriores en el medio correspondiente.
- *Disolución de dímero-D* $0.005 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$: se prepara una disolución de dímero-D de $5.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ por dilución adecuada del reactivo comercial (1.0 mg mL^{-1}) en PBS NaCl 0.01 M (pH 7.4). Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de las disoluciones anteriores en el medio correspondiente.
- *Disolución de TNF- α* 10.0 ng mL^{-1} : se prepara una disolución de TNF- α de $1.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ por dilución adecuada del reactivo comercial ($200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) o PBST 0.01 M (pH 7.5). Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior en el medio correspondiente.
- *Disolución de ER α* 5.0 ng mL^{-1} : se prepara por dilución adecuada del reactivo comercial (110 ng mL^{-1}) en el medio correspondiente, dependiendo del ensayo.
- *Disolución de PR* 5.0 ng mL^{-1} : se prepara por dilución adecuada del reactivo comercial (100 ng mL^{-1}) en el medio correspondiente, dependiendo del ensayo.

- *Disolución de HER-2 5.0 ng mL⁻¹*: se prepara por dilución adecuada del reactivo comercial (125 ng mL⁻¹) en el medio correspondiente, dependiendo del ensayo.
- *Disolución de GST-p53 200 ng mL⁻¹*: se prepara una disolución de GST-p53 de 10 µg mL⁻¹ por dilución adecuada del reactivo comercial (500 µg mL⁻¹) en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v). Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior en el medio correspondiente.

Disoluciones empleadas para la activación y bloqueo de HOOC-MBs:

- *Disolución de EDC/Sulfo-NHS 50 mg mL⁻¹*: Se prepara en el momento de su empleo disolviendo 10 mg de EDC y 10 mg de Sulfo-NHS en 200 µL de MES 0.025 M (pH 5.0).
- *Disolución de etanolamina 1 M*: Se prepara justo antes de su uso diluyendo 30 µL del reactivo comercial en 500 µL de disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0).

3.2.3. MUESTRAS

- Muestra de plasma con un contenido certificado de Fbg (2.7 mg mL⁻¹) (WHO 3rd International Standard for Fib Plasma (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, code: 09/264, UK)): se reconstituye el contenido de la ampolla (2.7 mg) en 1 mL de agua desionizada a temperatura ambiente, disolviendo el contenido mediante agitación suave.
- Muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide en tratamiento con corticoides proporcionadas por el Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid), almacenadas a -20 °C tras su recepción.
- Muestras de lisados de células MCF-7, MDA-MB-436, BxPC3, SK-BR-3, SW480, SW620 del repositorio de células American Type Culture Collection (ATCC) y de KM12C y KM12SM del laboratorio I. Fidler's (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). Los procedimientos de cultivo y lisado celular, detallados en el Apdo. 3.3.3.3 se realizaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (Dr. Rodrigo Barderas y María Garranzo-Asensio).

- Muestras de suero humano de varón tipo AB (ref. H4522, Sigma-Aldrich, España) y de voluntarios sanos (Biodonostia Health Research Institute).
- Muestras de células enteras MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-436.
- Muestras de suero de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon (en base a los antecedentes familiares y a los resultados de pruebas de sangre oculta en heces) obtenidas del biobanco del Instituto de Investigación de la Salud (IdiSSC), Red Nacional de Biobancos del ISCIII, Hospital Universitario Clínico San Carlos (Madrid), y de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y de ovario proporcionadas por el Hospital La Paz (Madrid) y el Hospital Puerta de Hierro (Madrid) tras el consentimiento de los mismos y aprobación por parte de los comités éticos de las Instituciones.
- Muestras de RNA_t extraído de líneas celulares de mama (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3), útero (HeLa), colon (SW480, SW420) y páncreas (BxPC3), y de citologías y tejidos frescos y parafinados de pacientes con cáncer de mama proporcionadas por el Hospital Universitario de Getafe (Madrid) tras la aprobación del comité ético del centro. Los procedimientos experimentales de extracción del RNA_t de cada tipo de muestra mediante protocolos establecidos, descritos en el Apdo. 3.3.3.6, se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (Dr. Rodrigo Barderas y María Garranzo-Asensio) y en el Departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CiB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid (CSIC) (Dres. Eva López-Hernández y José María Sánchez-Puelles).

Las muestras de tejidos frescos tumorales (T) y pareados adyacentes (NT) de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama se tomaron tras el consentimiento aprobado por el Hospital de Getafe (Madrid) inmediatamente después de la escisión quirúrgica del tumor, y tras ser analizadas por el patólogo a cargo con el fin de asegurar que la muestra no comprometía el diagnóstico final del paciente.

Seguidamente, se seccionaron piezas con un tamaño comprendido entre 0.3 y 0.5 cm, se sumergieron en viales conteniendo un reactivo estabilizante (RNAlater) y se almacenaron a 4 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se eliminaba el reactivo y los tejidos se almacenaban a -80 °C.

Para la obtención de las citologías de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, la superficie del tumor se raspó con una cuchilla y el raspado resultante se almacenó a temperatura ambiente durante un tiempo inferior a 60 minutos en un medio a base de metanol (ThinPrep PreservCyt® Solution, Hologic Inc, Marlborough, MA, USA). Seguidamente, las muestras se centrifugaron y los gránulos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su empleo.

- Muestras de saliva de individuos sanos obtenidas empleando el dispositivo de recolección Salivette® (Sarstedt). Tras un enjuague con agua, el voluntario mantenía el algodón del dispositivo en la boca durante 1 minuto aproximadamente y, una vez impregnado de saliva, se introducía en el recipiente de recolección de acuerdo con el protocolo descrito en las especificaciones, centrifugándose durante 5 minutos a 5000 rpm. Las muestras de saliva obtenidas se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Los inmunosensores y genosensores amperométricos desarrollados a lo largo de esta Tesis Doctoral para la determinación individual o dual de biomarcadores de cáncer clínicamente relevantes, de carácter proteico y genético, se basan en el empleo de MBs comerciales, electrodos serigrafados desechables con una o dos superficies de carbono (SPCE y SPdCE), distintas estrategias de inmovilización de los bio-receptores específicos empleados en cada caso (anticuerpos, proteínas recombinantes y secuencias de DNA y RNA), y entidades moleculares adecuadas conjugadas a HRP para realizar el marcaje enzimático.

Tras la modificación adecuada de las MBs empleadas en cada caso siguiendo los procedimientos experimentales que se detallan en los Apdos. 3.3.1 y 3.3.2, se resuspendieron en el volumen correspondiente (5.0 o 50 μL para SPCE y SPdCE, respectivamente) de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) y se depositaron sobre la superficie del transductor correspondiente previamente embutido en una carcasa de teflón provista de uno (SPCE) o dos (SPdCE) imanes de neodimio, respectivamente.

A continuación, el conjunto transductor/carcasa, conectado al potencióstato a través del cable adecuado, se sumerge en una célula electroquímica que contiene 10 mL de

disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) y 1 mM de HQ (preparada en el momento de realizar la medida) bajo agitación magnética constante, y se procede a la detección amperométrica de los procesos de afinidad involucrados en la determinación de la diana de interés aplicando un potencial constante de -0.2 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Una vez estabilizada la corriente de fondo, se adicionan a la célula 50 μ L de una disolución de H_2O_2 0.1 M preparada, justo antes de la medida, en el mismo medio regulador y se registra la variación de la intensidad de corriente catódica que se produce como consecuencia del proceso de reducción enzimática del sustrato de la enzima (H_2O_2) mediada por la HQ.

Una vez alcanzado el estado estacionario (~ 100 s), se detiene la aplicación del potencial, se desecha el electrodo y se procede a realizar una nueva medida siguiendo el mismo procedimiento descrito. Tras cada medida amperométrica se determina el valor de la variación de la intensidad de corriente catódica correspondiente a la diferencia entre la corriente alcanzada en el estado estacionario y la corriente de fondo estabilizada justo antes de la adición del H_2O_2 .

El potencial de detección aplicado para realizar la transducción amperométrica empleando el sistema HRP/ H_2O_2 /HQ, las concentraciones de H_2O_2 e HQ, y el procedimiento empleado para la captura magnética de las MBs sobre los transductores electroquímicos se optimizaron previamente en otros trabajos desarrollados en el mismo Grupo de Investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral [Gamella, 2012], [Conzuelo, 2012], [Esteban-Fernández de Ávila, 2013], [Eguílaz, 2010].

El mecanismo de reducción enzimática de H_2O_2 mediado por HQ (**Figura 21**) consiste en una primera etapa en la que el sustrato enzimático es reducido a H_2O por la forma reducida de HRP (HRP (Red)) que, a continuación, se regenera en presencia del mediador redox (HQ), que a su vez se reduce electroquímicamente en la superficie del transductor produciendo una variación de corriente catódica [Ahammad, 2013], [Camacho, 2007] en función de la cantidad de enzima inmovilizada en las MBs capturadas sobre la superficie del electrodo de trabajo.

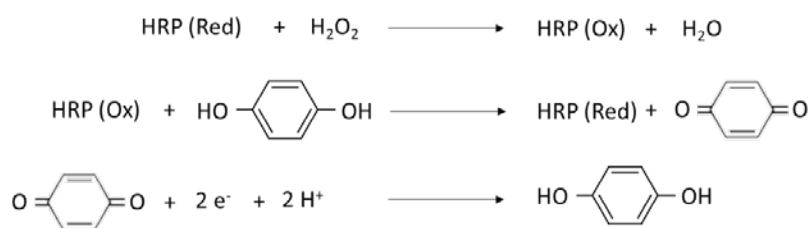


Figura 21: Etapas implicadas en la reducción del H_2O_2 catalizada por la enzima HRP en presencia del mediador redox HQ.

3.3.1. PREPARACIÓN DE BIOPLATAFORMAS AMPEROMÉTRICAS BASADAS EN MBs PARA LA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES CIRCULANTES DE CÁNCER

A continuación se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo para la fabricación de biosensores amperométricos basados en el empleo de distintos tipos de MBs y formatos de bioensayo para la determinación individual de biomarcadores circulantes de cáncer de naturaleza proteica y genética. Es importante destacar que, salvo en el caso de la determinación de HER-2 humana, los protocolos que se describen son los requeridos para realizar una única determinación requiriéndose su escalado dependiendo del número de determinaciones a realizar (n° de tubos eppendorf de 1.5 mL \times n° de determinaciones a realizar).

3.3.1.1. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES PROTEICOS

En esta sección se detallan los protocolos de fabricación de inmunosensores amperométricos para la determinación de Fbg, CD105, FGFR4, HER-2 humanas y autoanticuerpos humanos de tipo IgG frente a p53 (p53-AAs) basados en el empleo de Estrep-MBs, HOOC-MBs y HaloTag-MBs, proteínas modificadas y recombinantes y anticuerpos específicos como elementos de reconocimiento, y SPCEs como transductores electroquímicos.

En todos los casos las MBs modificadas se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0), se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE y se realiza la medida amperométrica siguiendo el procedimiento detallado en el Apdo. 3.3.

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de Fbg humano

Este inmunosensor se basa en el empleo de Estrep-MBs, Fbg biotinilado (biotin-Fbg), y anti-Fbg-HRP como marcador enzimático e implica un formato de tipo competitivo indirecto en el que el biotin-Fbg inmovilizado sobre Estrep-MBs y el Fbg presente en disolución compiten por los sitios de unión del anti-Fbg-HRP.

Para la modificación de las MBs se toma una alícuota de 5.0 μL de la suspensión comercial de Estrep-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavan por duplicado con 100 μL de B&W (pH 7.5), imantado la suspensión durante 3 minutos en el concentrador magnético entre cada lavado y retirando el sobrenadante. A continuación, las MBs se incuban con 100 μL de una disolución de biotin-Fbg 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en B&W (pH 7.5) durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C bajo agitación constante (950 rpm). Las Fbg-biotin-Estrep-MBs se lavan dos veces con 100 μL de PBST 0.01 M (pH 7.5) y se incuban en 100 μL de una disolución mezcla que contiene Fbg en la concentración correspondiente y 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP, preparada en PBS NaCl 0.01 M (pH 7.4). Tras 30 minutos de incubación en las mismas condiciones de temperatura y agitación, las MBs modificadas se lavan dos veces con 100 μL de PBST y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de CD105 humana

Este inmunosensor se basa en un formato de inmunoensayo tipo sándwich con un anticuerpo de detección conjugado a HRP implementado sobre HOOC-MBs, previa activación de los grupos carboxilo de su superficie mediante el sistema EDC/Sulfo-NHS para la inmovilización covalente del anticuerpo de captura.

Para ello, se toma una alícuota de 3.0 μL de la suspensión comercial de HOOC-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se realizan dos lavados con 50 μL de disolución MES 0.025 M (pH 5.0) durante 10 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) y se retira el sobrenadante tras 4 minutos de imantación. A continuación, las MBs se incuban durante 35 minutos bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores, en 25 μL de una disolución mezcla de EDC y Sulfo-NHS (50 mg mL^{-1}) preparada en MES 0.025 M (pH 5.0) produciéndose la activación de los grupos carboxilo presentes en la superficie de las MBs. La suspensión de MBs activadas se imanta durante 4 minutos, se retira el sobrenadante, se lava dos veces con

50 μL de MES (pH 5.0) y se incuban durante 15 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 25 μL de disolución anti-CD105 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en MES (pH 5.0). Tras realizar otros dos lavados con el medio anterior, las anti-CD105-MBs se bloquean durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 25 μL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0). Tras realizar un lavado con 50 μL de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2) y dos con disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), las anti-CD105-MBs se incuban durante 30 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 25 μL de una disolución de anti-CD105-HRP (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) suplementada con concentraciones variables de estándar de CD105 humana, preparada en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), produciéndose simultáneamente la captura específica y el marcaje enzimático de la proteína diana. Finalmente, los bioconjugados magnéticos HRP-anti-CD105-CD105-anti-CD105-MBs se lavan dos veces con 50 μL de PBST 0.01 M (pH 7.5) y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de FGFR4 humana

La estrategia empleada para la determinación de FGFR4 humana se basó en un formato de inmunoensayo tipo sándwich empleando HOOC-MBs, un anticuerpo de detección biotinilado (b-anti-FGFR4) y un conjugado de Estrep-HRP como marcaje enzimático.

Tras depositar una alícuota de 3.0 μL de la suspensión comercial de HOOC-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se realizan las etapas de lavado y activación de los grupos carboxilo de las MBs siguiendo el mismo procedimiento descrito para el inmunosensor de CD105. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura (anti-FGFR4) se lleva a cabo por incubación de las MBs activadas en 25 μL de una disolución de anti-FGFR4 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en MES 0.025 M (pH 5.0), durante 15 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ y 950 rpm. Se realizan dos lavados con 50 μL del medio anterior y se bloquean los grupos carboxilo activados remanentes incubando las anti-FGFR4-MBs en 25 μL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0) durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm). Tras realizar un lavado con 50 μL de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2) y dos con disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), las MBs se incuban durante 15 minutos, bajo las mismas condiciones anteriores de temperatura y agitación, en 25 μL de una disolución mezcla que contiene 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de b-anti-FGFR4, Estrep-HRP (dilución 1:1000) y concentraciones

variables de estándar de FGFR4 humana, preparada en el medio anterior, transcurriendo en una única etapa la captura, el inmunoreconocimiento y el marcaje enzimático del receptor diana. Por último, las HRP-Estrep-b-anti-FGFR4-FGFR4-anti-FGFR4-MBs se lavan dos veces con 50 μL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

- Inmunosensores amperométricos para la determinación de HER-2 humana

Este inmunosensor también se basa en una configuración de inmunoensayo tipo sándwich con un anticuerpo de detección conjugado a HRP, sobre HOOC-MBs.

Para su preparación se transfiere una alícuota de 6.0 μL de la suspensión comercial de HOOC-MBs a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se realizan dos lavados con 75 μL de MES 0.025 M (pH 5.0) durante 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ y 950 rpm y se activan durante 35 minutos, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, en 37.5 μL de una disolución mezcla de EDC/Sulfo-NHS (100 mM), preparada en el medio regulador anterior. Seguidamente, las MBs activadas se imantan durante 2 minutos en un concentrador magnético, se retira el sobrenadante, se lavan dos veces con 75 μL de MES (pH 5.0) y se incuban durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 37.5 μL de una disolución de anti-HER-2 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en MES (pH 5.0). A continuación se realizan dos lavados con 75 μL de MES (pH 5.0), se bloquean los grupos activados residuales por incubación durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 37.5 μL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0) y se realizan dos lavados con 75 μL de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2) y uno con PBST 0.01 M (pH 7.5). Las anti-HER-2-MBs bloqueadas se incuban durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) en 37.5 μL de disoluciones mezcla que contienen 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-HER-2-HRP y la concentración correspondiente de HER-2 humana, preparadas en PBST 0.01 M (pH 7.5). Tras el proceso de reconocimiento y marcaje enzimático del receptor de interés, los conjugados obtenidos se lavan por duplicado con 75 μL de PBST 0.01 M (pH 7.5) y se resuspenden en 150 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0), empleándose alícuotas de 50 μL de la suspensión final para cada determinación.

- *Inmunosensores amperométricos para la determinación de autoanticuerpos de tipo IgG humano frente a p53 (p53-AAs)*

Los inmunosensores para IgGs humanas específicas al supresor tumoral p53 (p53-AAs) se prepararon mediante la tecnología HaloTag que permite, de manera simultánea, llevar a cabo la expresión *in vitro* y la inmovilización covalente de la proteína p53 fusionada a HaloTag sobre MBs capaces de reconocer este ligando (HaloTag-MBs).

Los protocolos desarrollados para la construcción de los plásmidos, clonación de los genes de las proteínas p53, p63 y p73 y su expresión *in vitro*, fueron realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (Dr. Rodrigo Barderas y María Garranzo-Asensio), de acuerdo a los procedimientos que se detallan a continuación:

Los plásmidos de cDNA conteniendo los genes *TP53*, *TP63* y *TP73* en los vectores pDONR221 o pENTR223 se obtuvieron del depósito de plásmidos DNASU (<https://dnasu.org/DNASU/Home.do>). Los marcos abiertos de lectura (ORFs) se transfirieron al vector de destino pANT7_cHalo mediante recombinación LR (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la expresión *in vitro* de las proteínas fusionadas al tag Halo en su extremo C_t. Para construir el plásmido pANT7_cHalo compatible con la tecnología Gateway, se llevó a cabo la digestión de pANT7_cGST con las enzimas de restricción *XhoI* y *BstBI* para retirar el gen GST. El vector pFN18a conteniendo el gen HaloTag se amplificó mediante PCR empleando las secuencias iniciadoras 5'-AAACTCGAGATGGCAGAAATCGGT-3' y 5'-AAATTCGAATTAACCGGAAATCTC-3' (IDT Integrated DNA Technologies) y, tras el proceso de purificación, el producto de PCR obtenido y digerido con *XhoI* y *BstBI*, se ligó al plásmido pANT7_cGST mediante DNA T4 ligasa y se transformó en células DB3.1 que se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con cloranfenicol y ampicilina. Tras la purificación del plásmido empleando el kit comercial NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA), se obtuvieron los vectores de expresión codificantes para p53, p63 y p73 fusionadas al tag Halo mediante reacciones de recombinación LR clonasa (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante, que se transformaron en células DH5 α de *E. coli* crecidas en 250 mL de LB suplementado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, para ser finalmente purificados (kit NucleoBond Xtra Midi). Las proteínas de fusión p53, p63 y p73 se expresaron en lisados de reticulocito de ratón T7 (Promega Corporation, Madison, WI) de

acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un volumen de 20 μL conteniendo 500 ng de los DNAs plasmídicos correspondientes [Garranzo-Asensio, 2016].

La preparación de los biosensores para p53-AAs se llevó a cabo incubando alícuotas de 1.0 μL de la suspensión comercial de HaloTag-MBs, previamente lavadas cuatro veces (5 minutos a 800 rpm y 25 $^{\circ}\text{C}$) con 500 μL de disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5) y 0.05 % (v/v) de Tritón, en 1.8 μL del producto de transcripción/traducción obtenido previamente, durante 2 horas a 25 $^{\circ}\text{C}$ y 800 rpm, produciéndose la expresión y captura de la proteína HaloTag de fusión correspondiente (HaloTag-proteína) sobre las HaloTag-MBs. A continuación, las p53-MBs se lavan cinco veces con 500 μL de la disolución reguladora anterior (5 minutos a 800 rpm y 25 $^{\circ}\text{C}$), se elimina el exceso de HaloTag-proteína y se incuban en 500 μL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) y PBS (1:1) durante 2 horas, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores, con el objetivo de bloquear los sitios libres de las MBs que no se han modificado con la proteína de fusión. Una vez finalizada esta etapa, las p53-MBs se incuban durante 60 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 800 rpm) con 50 μL de estándares de p53-AAs de concentración variable preparados en PBS 0.01 M suplementada con 0.1 % (v/v) de Tween[®] 20 y 3 % (p/v) de leche desnatada en polvo y, tras 5 lavados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se lleva a cabo el marcaje enzimático de los p53-AAs capturados mediante su incubación en 50 μL de disolución de anti-IgG-HRP (dilución 1:600) preparada en el mismo medio, durante 30 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 800 rpm). Finalmente, los conjugados HRP-anti-p53-AAs-p53-AAs-p53-MBs obtenidos se lavan cinco veces con 500 μL de disolución reguladora de PBST 0.01 M (pH 7.5) y 0.05 % (v/v) de Tritón y se lleva a cabo la detección amperométrica tras resuspenderlos en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

3.3.1.2. DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES GENÉTICOS

En esta sección se describen los procedimientos experimentales desarrollados para la fabricación de biosensores para la determinación individual de biomarcadores genéticos relevantes (miRNAs) empleando MBs comerciales (Quitina-MBs, Estrep-MBs y ProtG-MBs), proteínas virales, anticuerpos selectivos y estrategias de amplificación isoterma.

3.3.1.2.1. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO PROTEÍNAS VIRALES

Se han desarrollado dos estrategias biosensoras empleando la proteína viral p19 como elemento de reconocimiento, basadas en la formación de homohíbridos de RNA de un tamaño comprendido entre 19–21 bp (ds-RNA), independientemente de su secuencia, mediante procesos de hibridación homogénea entre las secuencias del miRNA diana y sondas de RNA fosforiladas complementarias y biotiniladas en su extremo 3', reconocimiento específico de los ds-RNA formados por la proteína p19 (empleada como bio-receptor de captura o detección), y marcaje enzimático de los conjugados obtenidos en cada caso. Los procedimientos experimentales, en función del papel que desempeña la proteína p19, se describen a continuación:

- Biosensores basados en el empleo de la proteína p19 como bio-receptor de captura

Los híbridos ds-RNA se obtienen por hibridación homogénea incubando, durante 30 minutos a 25 °C y 250 rpm, disoluciones que contienen 0.01 µM de biotin-anti-miRNA-21 fosforilada y concentraciones variables de miRNA-21 fosforilado, preparadas en disolución reguladora 1×p19 (pH 7.0).

Por otro lado, la modificación de las Quitina-MBs consiste en tomar una alícuota de 2.5 µL de la suspensión comercial de las mismas e incubarlas en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 3.0 µL (30.0 U) de la disolución comercial de proteína p19, durante 20 minutos a 25 °C y a 950 rpm, produciéndose la inmovilización de la p19 sobre la superficie de las MBs a través de su dominio CBD. A continuación, las p19-MBs se imantan durante 3 minutos, se retira el sobrenadante, se resuspenden en 20 µL de una disolución que contiene 10 µL de los híbridos ds-RNA formados previamente en disolución, 1.0 µL de disolución reguladora 10×p19 (pH 7.0), 2.0 µL de una disolución de BSA 1 mg mL⁻¹ y agua esterilizada, y se incuban durante 60 minutos en las condiciones de temperatura y agitación anteriores. Transcurrida

esta etapa, las ds-RNA-p19-MBs se lavan con 100 μL de disolución reguladora 1 \times Wash Buffer (pH 7.0) precalentada a 37 $^{\circ}\text{C}$, y se incuban durante 15 minutos en 25 μL del conjugado Estrep-HRP (dilución 1:1000), preparada en el medio regulador anterior para realizar el marcaje del homohíbrido de RNA biotinilado capturado. Por último, las HRP-Estrep-ds-RNA-p19-MBs se lavan tres veces con 500 μL de disolución reguladora 1 \times Wash Buffer, incubándolas 5 minutos (25 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm) durante cada lavado y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

- Biosensores basados en el empleo de la proteína p19 como bio-receptor de detección

En este caso, los híbridos ds-RNA se obtienen preparando mezclas de hibridación que contienen 0.1 μM de biotin-anti-miRNA-21 fosforilada y concentraciones variables de miRNA-21 fosforilado, en disolución reguladora 1 \times p19 (pH 7.0) e incubándolas durante 30 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ y a 250 rpm.

A continuación, se toma una alícuota de 5.0 μL de la suspensión comercial de Estrep-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se lavan dos veces con 50 μL de disolución reguladora B&W (pH 7.5), imantando las MBs en un concentrador magnético durante 3 minutos entre cada lavado, y se incuban en 20 μL de una disolución que contiene 10 μL de los híbridos ds-RNA obtenidos en la etapa anterior, 3.0 μL (30.0 U) de la disolución comercial de proteína p19, 1.0 μL de disolución reguladora 10 \times p19 (pH 7.0), 2.0 μL de disolución de BSA 1 mg mL^{-1} y agua esterilizada, durante 15 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ y 950 rpm, produciéndose de manera simultánea la inmovilización de los ds-RNA sobre las MBs y su reconocimiento por la proteína p19. Tras imantar las p19-ds-RNA-MBs durante 3 minutos y retirar el exceso de sobrenadante, se lavan por duplicado con 100 μL de disolución reguladora 1 \times Wash Buffer (pH 7.0) precalentada a 37 $^{\circ}\text{C}$, y se incuban durante 15 minutos, en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores, en 25 μL de una disolución de anti-MBP-HRP (dilución 1:1000) preparada en el medio regulador anterior. Finalmente, se realizan tres lavados de las HRP-anti-MBP-p19-ds-RNA-MBs incubándolas 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ y a 950 rpm con 500 μL de disolución reguladora 1 \times Wash Buffer (pH 7.0) precalentada a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

3.3.1.2.2. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS

Mediante el empleo de anticuerpos selectivos a heterohíbridos de DNA-RNA (Ab S9.6) independientemente de su secuencia y su tamaño, se han desarrollado dos estrategias biosensoras para la determinación de miRNAs basadas en procesos de hibridación homogénea o heterogénea entre el miRNA objetivo y su sonda complementaria de DNA biotinilada en el extremo 3' (b-anti-DNA), reconocimiento de los heterohíbridos formados por el Ab S9.6 (empleado como bio-receptor de captura o de detección), y marcaje enzimático de los conjugados formados en cada caso, siguiendo los procedimientos que se detallan a continuación:

- Biosensores basados en el empleo de Ab S9.6 como bio-receptor de captura

La obtención de los heterohíbridos biotinilados (b-DNA-miRNA) se lleva a cabo incubando, durante 45 minutos a 37 °C y 950 rpm, disoluciones mezcla que contienen 0.05 µM de b-anti-DNA-205 y la concentración correspondiente de miRNA-205, preparadas en disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.5) esterilizada.

Por otro lado, se toma una alícuota de 2.5 µL de la suspensión comercial de ProtG-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se lavan dos veces con 50 µL de PBS 0.01 M (pH 7.5) esterilizado, se retira el sobrenadante tras 3 minutos de imantación y se incuban en 25 µL de disolución de Ab S9.6 2.0 µg mL⁻¹ preparado en el medio regulador anterior, durante 45 minutos a 37 °C y 950 rpm. Tras la obtención de Ab S9.6-MBs mediante interacción entre la proteína bacteriana de las MBs y la región Fc del anticuerpo S9.6, se lavan dos veces con 50 µL de 0.01 M PBS (pH 7.5) y, a continuación, se incuban en 25 µL de disoluciones de b-DNA-miRNA, durante 45 minutos, en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores. Tras la captura específica de los heterohíbridos, las b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs se lavan dos veces con 50 µL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), se incuban en 25 µL de una disolución de Estrep-HRP (dilución 1:25000) preparada en el medio regulador anterior, durante 30 minutos a 37 °C y 950 rpm, y los conjugados HRP-Estrep-anti-DNA-205-miRNA-205-Ab S9.6-MBs obtenidos se lavan por duplicado con 50 µL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) y se resuspenden en 50 µL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

- Biosensores basados en el empleo de Ab S9.6 como bio-receptor de detección

Los biosensores desarrollados para la determinación de miRNAs basados en Ab S9.6 como elemento de detección se preparan transfiriendo una alícuota de 5.0 μL de la suspensión comercial de Estrep-MBs a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y realizando dos lavados con 50 μL de disolución reguladora B&W esterilizada (pH 7.5), descartando el sobrenadante tras 3 minutos de imantación. Las MBs lavadas se incuban en 25 μL de disolución de b-anti-DNA-21 0.1 μM preparada en B&W (pH 7.5) durante 30 minutos a 30 °C y 950 rpm, y las b-anti-DNA-21-MBs resultantes se lavan dos veces con 50 μL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v). Seguidamente, las MBs se incuban durante 30 minutos (30 °C, 950 rpm) en 25 μL de una disolución mezcla de Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 (ambos reactivos a 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), preparada en el medio anterior y pre-incubada a temperatura ambiente durante 60 minutos, suplementada con la concentración correspondiente de miRNA-21, produciéndose la hibridación heterogénea entre el miRNA diana y su sonda complementaria de DNA inmovilizada sobre las MBs, el reconocimiento específico de los DNA-miRNAs formados por el Ab S9.6 y el marcaje enzimático de los conjugados Ab S9.6-miRNA-DNA-MBs con ProtA-poli-HRP40, mediante la interacción entre la proteína bacteriana y la región Fc del Ab S9.6. Los conjugados obtenidos se lavan dos veces con 50 μL de disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) siguiendo los procedimientos de imantación descritos anteriormente y se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

3.3.1.2.3. DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN ISOTERMAS

La metodología desarrollada para la determinación de miRNAs mediante la reacción de hibridación en cadena (HCR, por sus siglas en inglés, *Hybridization Chain Reaction*) se basa en el empleo de secuencias de DNA lineales modificadas con biotina en el extremo 3' (b-Cp) y sin modificar (Dp), complementarias a distintas regiones de la secuencia de miRNA-21, secuencias de DNA de tipo horquilla biotiniladas en el extremo 5' (b-H₁ y b-H₂) que hibridan entre sí y con la región libre de Dp para formar un homohíbrido de tipo DNA-DNA con múltiples unidades de biotina, y un conjugado de Estrep-HRP para llevar a cabo el marcaje enzimático de las mismas. Previamente a su utilización, las secuencias b-H₁ y b-H₂

se calentaron en un termociclador a 95 °C durante 10 minutos y a continuación se dejaron enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Para preparar los biosensores se toma una alícuota de 5.0 µL de la suspensión comercial de Estrep-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se lavan dos veces con 50 µL de disolución reguladora de B&W esterilizado (pH 7.5) y se incuban durante 60 minutos, a 37 °C y 950 rpm, en 25 µL de una disolución de b-Cp 2.0 µM preparada en el medio regulador anterior. Las b-Cp-MBs resultantes se lavan dos veces con 50 µL de SSC (pH 7.4) y se incuban durante 15 minutos (37 °C, 950 rpm), en 25 µL de una disolución mezcla que contiene 0.25 µM de Dp, 0.5 µM de b-H₁ y b-H₂, respectivamente, y la concentración adecuada del miRNA-21 sintético, preparada en SSC (pH 7.4), produciéndose la hibridación del miRNA diana con b-Cp y con Dp presente en disolución, y la de Dp con b-H₁, así como la hibridación secuencial entre b-H₁ y b-H₂. Tras el proceso de HCR, se obtienen los conjugados (b-H₂-b-H₁)_n-Dp-miRNA-21-b-Cp-MBs, que se lavan dos veces con disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) y se incuban durante 30 minutos (37 °C, 950 rpm) con 25 µL de Estrep-HRP (dilución 1:2500) preparada en el medio anterior. Por último, los (HRP-Estrep)_n-(b-H₂-b-H₁)_n-Dp-miRNA-21-b-Cp-MBs se lavan otras dos veces con la disolución reguladora anterior y se resuspenden en 50 µL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0).

3.3.2. PREPARACIÓN DE BIOPLATAFORMAS AMPEROMÉTRICAS BASADAS EN MBs PARA LA MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

En este apartado se describen los procedimientos experimentales desarrollados para la determinación dual de biomarcadores circulantes de cáncer del mismo (miRNAs) o de distinto (proteína y RNA mensajero asociado) nivel molecular, mediante estrategias basadas en la proteína p19 y el anticuerpo S9.6 como receptores de captura para la determinación de miRNAs, y formatos de inmunoensayo tipo sándwich y procesos de hibridación heterogénea, respectivamente.

Tras la modificación de las MBs siguiendo los procedimientos experimentales que se describen a continuación, cada lote de MBs modificadas se resuspenden en 5.0 µL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) que se depositan en la superficie de los electrodos de trabajo del SPdCE (W₁ y W₂, respectivamente), y se lleva a cabo el proceso de

transducción amperométrica de acuerdo al procedimiento descrito en detalle en el Apdo. 3.3.

A continuación se detallan los procedimientos de modificación de las MBs para la fabricación de plataformas para la determinación dual de biomarcadores circulantes de cáncer, agrupadas según el nivel molecular de los mismos.

- Plataformas biosensoras para la determinación de biomarcadores de la misma naturaleza

Se han desarrollado dos plataformas para la determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 basadas en la formación de homohíbridos de RNA (ds-RNA) y heterohíbridos de DNA-RNA conteniendo la secuencia del miRNA diana de interés, su reconocimiento específico por Quitina-MBs y ProtG-MBs modificadas con el receptor de captura correspondiente en cada caso (p19-MBs y Ab S9.6-MBs, respectivamente) y el marcaje enzimático de los híbridos biotinilados capturados mediante el conjugado de Estrep-HRP.

Los procedimientos experimentales desarrollados en cada caso son los mismos que los descritos en los Apdos. 3.3.1.2.1 y 3.3.1.2.2, respectivamente, para la determinación individual de miRNAs, con mínimas modificaciones.

La plataforma para la determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 basadas en la proteína p19 como bio-receptor de captura, consiste en la preparación de mezclas de hibridación independientes (una para cada miRNA objetivo) y en la modificación simultánea de lotes distintos de Quitina-MBs.

Para obtener los ds-RNAs correspondientes se preparan mezclas conteniendo 0.01 μ M de la sonda de RNA fosforilada y biotinilada complementaria a cada miRNA objetivo (b-anti-miRNA-21 o b-anti-miRNA-205) y las concentraciones adecuadas del miRNA diana fosforilado en cada caso (miRNA-21 o miRNA-205) en disolución reguladora 1 \times p19 Binding Buffer (pH 7.0), y se incuban a 25 °C y 250 rpm durante 30 minutos.

La modificación de lotes individuales de Quitina-MBs se lleva a cabo siguiendo exactamente el mismo procedimiento experimental descrito en el Apdo. 3.3.1.2.1.

Los biosensores para la determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 basados en el empleo de ProtG-MBs y Ab S9.6 como elemento receptor de captura se preparan, como en el caso de la metodología individual, llevando a cabo una primera etapa de incubación, a 37 °C y 950 rpm, de mezclas conteniendo 0.05 µM de la sonda de DNA biotinilada y complementaria a cada miRNA (b-anti-DNA-21 o b-anti-DNA-205) suplementada con la concentración correspondiente del miRNA sintético de interés en cada caso, en disolución reguladora de PBS (pH 7.5) previamente esterilizada, durante 45 minutos. Simultáneamente, se lleva a cabo la modificación de lotes independientes de ProtG-MBs de acuerdo al procedimiento experimental descrito en detalle en el Apdo. 3.3.1.2.2.

- Plataformas biosensoras para la determinación de biomarcadores de distinta naturaleza

La plataforma dual desarrollada consiste en la modificación individual de lotes de HOOC-MBs y Estrep-MBs sobre las que se desarrollan inmuno-estrategias tipo sándwich y de hibridación directa para la determinación de la proteína IL-8 y su RNA mensajero asociado biotinilado en el extremo 5' (b-IL-8 mRNA), respectivamente.

Para la determinación del biomarcador proteico (IL-8) se toma una alícuota de 4.0 µL de la suspensión comercial de HOOC-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y, tras dos lavados de 10 minutos a 25 °C y 950 rpm con 50 µL de disolución reguladora MES 0.025 M (pH 5.0), las MBs se incuban en 25 µL de disolución mezcla de EDC/Sulfo-NHS 50 mg mL⁻¹ preparada en MES (pH 5.0), durante 35 minutos en las condiciones de temperatura y agitación anteriores. Una vez activados los grupos carboxilo de las MBs y tras dos lavados con 50 µL del medio anterior, se lleva a cabo la inmovilización del anticuerpo de captura mediante su incubación durante 60 minutos (25 °C, 950 rpm) en 25 µL de disolución de anti-IL-8 (dilución 1:20) preparada en MES (pH 5.0). Las anti-IL-8-MBs se lavan dos veces con 50 µL de MES (pH 5.0), se bloquean mediante su incubación en 25 µL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en disolución reguladora de fosfato 0.1 M (pH 8.0) durante 60 minutos (25 °C, 950 rpm), se lavan nuevamente dos veces con 50 µL de disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2) y una vez más con 50 µL de PBST (pH 7.5), se resuspenden en 100 µL de una mezcla que contiene concentraciones variables del estándar de IL-8 y del b-IL-8 mRNA, preparada en PBST (pH 7.5), y se incuban durante 30 minutos (25

°C, 950 rpm). Tras el reconocimiento específico de IL-8, las IL-8-anti-IL-8-MBs se lavan dos veces con 50 µL de PBST (pH 7.5), se incuban durante 30 minutos en 25 µL de disolución de b-anti-IL-8 (dilución 1:10) preparada en PBST (pH 7.5) y, tras dos lavados siguiendo el procedimiento anterior, se incuban durante 45 minutos, a 25 °C y 950 rpm, con 25 µL del conjugado Estrep-HRP (1:1000) preparado en PBST (pH 7.5). Por último, las MBs modificadas se lavan por duplicado con 50 µL de PBST (pH 7.5).

La estrategia desarrollada para la determinación del biomarcador genético, descrita a continuación, consiste en la modificación de Estrep-MBs con sondas de DNA de tipo horquilla biotiniladas en su extremo 5' (b-HCp-IL-8) y su hibridación directa con b-IL-8 mRNA.

Para ello se toma una alícuota de 3.0 µL de la suspensión comercial de Estrep-MBs en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que se lavan dos veces con 100 µL de disolución reguladora de B&W (pH 7.5) y se incuban durante 60 minutos, a 25 °C y 950 rpm, con 25 µL de una disolución 0.5 µM de b-HCp-IL-8 preparada en el medio regulador anterior. Tras realizar tres lavados con 100 µL de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2), las b-HCp-IL-8-MBs se incuban en 100 µL de una disolución que contiene las concentraciones correspondientes de IL-8 y b-IL-8 mRNA, en PBST (pH 7.5), durante 30 minutos en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores, produciéndose la hibridación eficiente entre b-HCp-IL-8 inmovilizada en la superficie de las MBs y el b-IL-8 mRNA presente en disolución. Seguidamente, los conjugados b-IL-8 mRNA-HCp-IL-8-MBs se lavan dos veces con 50 µL de PBST (pH 7.5) y se marcan enzimáticamente mediante su incubación en 25 µL de disolución de Estrep-HRP (dilución 1:1000) preparada en el mismo medio regulador anterior, durante 15 minutos (25 °C, 950 rpm). Finalmente, las HRP-Estrep-b-IL-8 mRNA-HCp-IL-8-MBs se lavan dos veces con 50 µL de PBST (pH 7.5).

3.3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS

La aplicabilidad práctica de los distintos biosensores desarrollados se ha demostrado mediante el análisis de los biomarcadores de interés en una gran variedad de muestras clínicas de distinta naturaleza y complejidad.

3.3.3.1. DETERMINACIÓN EN UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

El inmunosensor de Fbg desarrollado se ha aplicado al análisis de una muestra de plasma humano con un contenido certificado de Fbg. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, el contenido total de la ampolla (2.7 mg) se reconstituyó en 1 mL de agua desionizada a temperatura ambiente. La determinación de Fbg se lleva a cabo incubando las Fbg-biotin-Estrep-MBs en 25 μ L de la muestra de plasma diluida 54000 veces con disolución reguladora de PBS NaCl (pH 7.5) y suplementada con 0.5 μ g mL⁻¹ de anti-Fbg-HRP, de acuerdo con las condiciones experimentales descritas en el Apdo. 3.3.1.1 *“Inmunosensores para la determinación amperométrica de Fbg”*.

La ausencia de efecto matriz se comprobó comparando las respuestas amperométricas obtenidas para la muestra de plasma, convenientemente diluida para que la concentración final de Fbg sea de 0.005, 0.05 y 0.5 μ g mL⁻¹, suplementada con 0.5 μ g mL⁻¹ de anti-Fbg-HRP, con las respuestas obtenidas para estándares de Fbg a los mismos niveles de concentración, preparadas en PBS NaCl (pH 7.5), por lo que la determinación del contenido de Fbg en la muestra certificada se llevó a cabo por interpolación del valor de la intensidad de corriente obtenida en el calibrado construido para estándares de Fbg.

3.3.3.2. DETERMINACIÓN EN SUERO

La determinación de CD105, HER-2 y p53-AAs empleando los inmunosensores desarrollados para cada biomarcador, se realizó en 4 muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide en tratamiento con corticoides, una muestra de suero humano comercial y dos de individuos sanos, y en 24 muestras de suero de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon y en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de colon (4) y ovario (2), respectivamente.

Una vez comprobada la ausencia de efecto matriz mediante la construcción de curvas de calibrado en las muestras diluidas 2 o 5 veces con disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), y suplementadas con concentraciones crecientes del estándar de CD105 hasta 5.0 ng mL⁻¹ y 1.0 μ g mL⁻¹ de anti-CD105-HRP, siguiendo el procedimiento experimental descrito en el Apdo. 3.3.1.1 *“Inmunosensores para la determinación amperométrica de CD105”*, la determinación de CD105 se llevó a cabo interpolando las

respuestas amperométricas obtenidas para cada una de las muestras en la curva de calibrado construida para estándares de CD105.

En cuanto al receptor HER-2, las anti-HER-2-MBs bloqueadas con etanolamina se incubaron con 37.5 μL de las muestras de suero correspondientes diluidas al 40 % con disolución reguladora de PBS suplementada con 1 M de NaCl, 2 % (v/v) de Tween® 20 y 0.5 % (p/v) de BSA, conteniendo 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-HER-2-HRP, manteniendo las condiciones experimentales descritas en el Apdo. 3.3.1.1 *“Inmunosensores para la determinación amperométrica de HER-2”*. Puesto que no se observó efecto matriz para las muestras de suero diluidas y suplementadas con estándares de HER-2 hasta un nivel de 4.0 ng mL^{-1} , el contenido de HER-2 en cada muestra se obtuvo interpolando las respuestas amperométricas obtenidas en la curva de calibrado construida para estándares de HER-2.

Por otro lado, la aplicabilidad real del inmunosensor para la determinación de p53-AAs se demostró mediante el análisis de 24 muestras de suero de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon, previamente seleccionadas de un total de 62 mediante el método ELISA y clasificadas como seropositivas (12) y seronegativas (12) a AAs frente a p53, y en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y de ovario.

De acuerdo con el procedimiento experimental descrito en *“Inmunosensores amperométricos para la determinación de autoanticuerpos frente a p53”* detallado en el Apdo. 3.3.1.1, las p53-HaloTag-MBs se incubaron en 50 μL de la muestra de suero correspondiente diluida 200 veces con disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.5) suplementada con 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y leche desnatada en polvo al 3 % (p/v), seguido de la etapa de marcaje enzimático con anti-IgG-HRP.

Nuevamente, dada la ausencia de efecto matriz en las muestras de suero previamente diluidas, las respuestas obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva de calibrado construida con el calibrador estándar para la determinación de AAs frente a p53 humana en suero.

3.3.3.3. DETERMINACIÓN EN LISADOS CELULARES

Este tipo de muestras se emplearon para demostrar la utilidad clínica real de los inmunosensores desarrollados para FGFR4 y HER-2.

Previamente a la determinación de cada tipo de receptor, las células se crecieron de acuerdo con los protocolos establecidos, a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5 % de CO₂ en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) rico en glucosa suplementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina y 2.5 mM de L-glutamina (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conteniendo los nutrientes recomendados. Tras el proceso de crecimiento, las células se lavan con PBS frío, se incuban durante 5 minutos en PBS suplementado con 4 mM de EDTA para separarlas de la superficie y se centrifugan a 1200 rpm eliminando el exceso de PBS y EDTA. Seguidamente, se resuspenden en 1 mL de disolución de lisis fría (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % de desoxicolato de sodio y 0.1 % SDS) suplementada con un cóctel de inhibidor de proteasa 1×, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1 mM de ortovanadato de sodio activado. Tras el proceso de lisis celular y de una etapa de incubación durante 10 minutos en hielo, las células se transfieren a un tubo de microcentrífuga empleando una aguja de calibre 25 conectada a una jeringa de 1 mL, se centrifugan durante 15 minutos a 13200 rpm y 4 °C, y los lisados resultantes se almacenan a -80 °C.

Una vez finalizado el procesamiento de la muestra seleccionada, la determinación del contenido endógeno de FGFR4 en lisados de células que expresan cantidades variables del receptor, incluyendo MCF-7, MDA-MB-436, SK-BR-3, KM12C, KM12SM, SW480, SW620 y BxPC3, se llevó a cabo incubando las anti-FGFR4-MBs, tras su bloqueo con etanolamina, en 25 µL de una disolución que contiene 2.5 µg de cada tipo de lisado, 1.0 µg mL⁻¹ de b-anti-FGFR4 y 1:1000 de Estrep-HRP, en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v), de acuerdo con el protocolo descrito en *"Inmunosensores amperométricos para la determinación de FGFR4"* (Apdo. 3.3.1.1).

A partir de la construcción de una curva de calibrado en presencia de 2.5 µg de lisado KM12SM (tomado como ejemplo representativo) suplementado con las concentraciones óptimas de b-anti-FGFR4 y Estrep-HRP y conteniendo concentraciones crecientes de FGFR4 estándar comprendidas entre 0.0 y 5000 pg mL⁻¹, se concluyó la ausencia de efecto matriz para la determinación de FGFR4 en este tipo de muestras, por lo que su contenido en cada una de las muestras analizadas se obtuvo interpolando las respuestas amperométricas obtenidas para cada lisado en la curva de calibrado construida para estándares de FGFR4.

De manera similar, el receptor HER-2 se determinó en lisados de células MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3 que expresan cantidades variables del mismo, empleando 2.5 µg para cada determinación, siguiendo el protocolo detallado en *“Inmunosensores amperométricos para la determinación de HER-2”* (Apdo. 3.3.1.1), e interpolando las respuestas amperométricas obtenidas para cada una de las muestras en el calibrado obtenido para estándares de HER-2. En este caso, la ausencia de efecto matriz se demostró tras la construcción de un calibrado en presencia de 2.5 µg de lisados de células SK-BR-3 suplementadas con concentraciones crecientes del estándar de HER-2 hasta un nivel correspondiente a 25 ng mL⁻¹, y 1.0 µg mL⁻¹ de anti-HER-2-HRP, en disolución reguladora de PBST (pH 7.5).

3.3.3.4. DETERMINACIÓN EN SALIVA

La utilidad real de la plataforma dual desarrollada para la proteína IL-8 y el IL-8 mRNA se llevó a cabo mediante la determinación del contenido endógeno del biomarcador proteico y realizando estudios de recuperación de ambos biomarcadores en 7 muestras de saliva de participantes sanos. Tras la recolección y centrifugación de las muestras, se evaluó la existencia de efecto matriz mediante la incubación de lotes individuales de anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MBs con 100 µL de muestras de saliva cruda sin diluir conteniendo concentraciones de IL-8 e IL-8 mRNA comprendidas entre 0.0 y 600 pg mL⁻¹ y 0.0 y 5.0 nM, respectivamente, siguiendo los procedimientos experimentales descritos para cada biomarcador en el Apdo. 3.3.2.

Debido al efecto matriz observado, el contenido endógeno de IL-8 en cada una de las muestras se determinó mediante el método de adiciones estándar a partir de curvas de calibrado realizadas en la muestra cruda conteniendo concentraciones crecientes de IL-8 hasta un nivel de 600 pg mL⁻¹.

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas entre los valores de las pendientes obtenidas para los calibrados construidos para ambos biomarcadores en muestras de saliva tomadas de 10 voluntarios distintos, permite el empleo de los calibrados obtenidos en una muestra de saliva representativa para la determinación de ambos biomarcadores en cualquier muestra de saliva.

De este modo, los resultados en estudios de recuperación obtenidos para 7 muestras contaminadas con 600 pg mL^{-1} y 2.5 nM de estándar de IL-8 y de b-IL-8 mRNA sintético, respectivamente, se obtuvieron por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en dichos calibrados.

3.3.3.5. DETERMINACIÓN EN CÉLULA ENTERA

La utilidad del inmunosensor de HER-2 también se demostró, de forma pionera empleando un biosensor electroquímico, realizando la determinación en células enteras de mama (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3).

Tras el bloqueo con etanolamina, las anti-HER-2-MBs se incubaron con cada uno de los cultivos celulares de acuerdo con el procedimiento experimental descrito anteriormente (*"Inmunosensores amperométricos para la determinación de HER-2"*, Apdo. 3.3.1.1) estimando el número de receptores de HER-2 por célula mediante interpolación de las respuestas obtenidas con el inmunosensor desarrollado en la curva de calibrado construida para estándares de HER-2, teniendo en cuenta el número de células empleadas en cada caso, el peso molecular de HER-2 y el número de Avogadro.

3.3.3.6. DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE RNA_t EXTRAÍDO DE LÍNEAS CELULARES, TEJIDOS FRESCOS Y EMBEBIDOS EN PARAFINA Y CITOLOGÍAS MAMARIAS

La utilidad real de los biosensores para miRNAs, tanto individuales como duales, se demostró determinando el contenido endógeno del miRNA diana en muestras de RNA_t extraído de distintas líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, MCF-10A, SK-BR-3, SW480, SW620 y BxPC3), y de citologías y tejidos de mama (T y NT) frescos y embebidos en parafina.

Las células MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, SK-BR-3, SW480, SW620 y BxPC3 se crecieron siguiendo el procedimiento experimental anteriormente descrito (Apdo. 3.3.3.3), mientras que las células MCF-10A se cultivaron en una mezcla de nutrientes rico en glucosa DMEM/F12 (1:1) suplementado con 2.5 mM de L-glutamina (Gibco), 5% (v/v) de suero equino (Gibco), 10 mg mL^{-1} de insulina humana (Sigma), 0.5 mg mL^{-1} de hidrocortisona (Sigma), 10 ng mL^{-1} de EGF y 100 ng mL^{-1} de toxina de cólera (QuadraTech Ltd).

Los procesos de extracción de RNA_t de las distintas líneas celulares, así como de las citologías y tejidos frescos de mama (T y NT) se llevaron a cabo empleando el procedimiento experimental basado en Trizol (Tri Reagent, Molecular Research Center, Inc.):

Para la extracción de RNA_t a partir de células, tras lavarlas con PBS se levantaron de la placa de cultivo y se centrifugaron. A continuación, el precipitado obtenido se resuspendió en Trizol y se homogeneizó durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de la extracción con cloroformo. El RNA_t obtenido en la fase acuosa superior se precipitó con alcohol isopropílico y se lavó dos veces con EtOH (70 % (v/v)). El precipitado se secó en estufa durante 10 minutos a 80 °C, se disolvió en agua libre de RNasas y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Este procedimiento fue el mismo empleado para la extracción de RNA_t de las muestras de citología.

Para la extracción de RNA_t de tejidos de mama (T y NT) frescos, las muestras se descongelaron, se pesaron, y se sumergieron en nitrógeno líquido para facilitar su homogeneización con ayuda de un mortero. Una vez homogeneizada la muestra, se llevó a cabo la extracción de RNA_t siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito anteriormente para la extracción de RNA_t de células empleando el volumen adecuado de Trizol (1 mL por 50–100 mg de tejido).

Por otro lado, la extracción de RNA_t de las muestras de tejidos parafinados se llevó a cabo empleando el kit comercial de extracción miRNeasy FFPE (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y eluyendo el extracto de RNA obtenido en 30 µL de agua libre de RNasas. La pureza de los extractos de RNA_t se evaluó a partir de los valores de absorbancia a 260, 230 y 280 nm obtenidas con un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). En todos los casos, la relación de absorbancias 260/280 y 260/230 se encontraba en el rango comprendido entre 2.0–2.2, lo que confirma la obtención de extractos de elevada pureza y, por lo tanto, adecuados para su análisis.

Empleando los protocolos experimentales optimizados para cada una de las metodologías de determinación de miRNAs, descritas en los Apdos. 3.3.1.2.1, 3.3.1.2.2 y 3.3.1.2.3, se evaluó la existencia de efecto matriz en presencia de RNA_t extraído de las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A, tomadas como ejemplos representativos, empleando

cantidades de RNA_t comprendidas entre 0.25–5.0 µg y suplementadas con concentraciones crecientes del miRNA sintético diana en cada caso.

La determinación del contenido endógeno del miRNA de interés en muestras de RNA_t de células y tejidos T y NT de mama, tanto frescos como embebidos en parafina, mediante las metodologías para las que no se observó efecto matriz, se llevó a cabo empleando 500 y 1000 ng de RNA_t extraído, respectivamente, interpolando las respuestas obtenidas en cada caso en el calibrado construido para el miRNA sintético correspondiente. Sin embargo, la determinación de miRNA-21 en este tipo de muestras mediante la metodología basada en el empleo de Ab S9.6 como bio-receptor de detección, se llevó a cabo por extrapolación en calibrados de adiciones estándar construidos para disoluciones preparadas con concentraciones crecientes del miRNA sintético diana preparado en presencia de 250 ng del RNA_t extraído de las células y tejidos frescos de mama (T o NT) a analizar.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE NATURALEZA PROTEICA EMPLEANDO LA METODOLOGÍA ELISA CONVENCIONAL

La comparación y validación de los resultados obtenidos con los inmunosensores desarrollados para la determinación de CD105, HER-2, p53-AAs, FGFR4 y la proteína IL-8 en muestras de suero (CD105, HER-2 y p53-AAs), lisados celulares (HER-2 y FGFR4) y saliva (proteína IL-8) se llevó a cabo mediante el análisis de cada uno de los biomarcadores de interés en las muestras seleccionadas empleando kits ELISA comerciales basados en formatos de ensayo tipo sándwich (CD105, HER-2, FGFR4 e IL-8) o indirectos (p53-AAs) que emplean los mismos inmunoreactivos que los dispositivos electroquímicos desarrollados, siguiendo las condiciones (medios de preparación y concentraciones de los distintos inmunoreactivos y marcajes enzimáticos, disoluciones reguladoras de lavados y bloqueo y volúmenes de incubación) y los procedimientos experimentales recomendados por cada fabricante.

Todas las etapas de modificación de los pocillos de la placa ELISA se realizaron a temperatura ambiente (excepto la etapa de adsorción del anticuerpo de captura específico en cada caso para las metodologías basadas en una configuración tipo sándwich), y protegiendo la placa durante cada etapa de incubación con papel de plata.

Las etapas principales involucradas en el desarrollo de las metodologías ELISA convencionales empleadas se describen, de manera general, a continuación:

- Procedimiento experimental empleando metodologías ELISA basadas en formatos tipo sándwich para la determinación de CD105, FGFR4, HER-2 e IL-8 humanas

En primer lugar, se lleva a cabo la incubación del anticuerpo de captura correspondiente sobre los pocillos de la placa durante 12 horas a 4 °C. Una vez finalizada esta etapa, se retira el exceso de la disolución y se realizan tres lavados con la disolución reguladora recomendada en cada caso descartando la disolución entre cada lavado y sacudiendo la placa suavemente sobre papel absorbente. A continuación, se realiza una etapa de bloqueo durante 60 o 120 minutos de la superficie activa de los pocillos con la disolución correspondiente, se retira la disolución anterior y se realizan tres lavados siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Seguidamente, o tras dejar secar la placa durante 24 horas a temperatura ambiente (de acuerdo con el procedimiento establecido para la proteína IL-8), se lleva a cabo el proceso de reconocimiento de la proteína de interés mediante la incubación de la disolución estándar correspondiente (o la muestra a analizar en cada caso) preparada en el medio recomendado por la casa comercial, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados siguiendo el procedimiento anterior y se lleva a cabo la incubación, durante el tiempo recomendado, del anticuerpo de detección conjugado a HRP (metodologías para CD105 y HER-2) o biotinilado (metodologías para FGFR4 e IL-8) en la concentración apropiada y preparado en la disolución reguladora correspondiente. En el caso del protocolo establecido para la proteína IL-8, el proceso de captura de la proteína y su reconocimiento por el anticuerpo de detección se realiza durante un tiempo de incubación de 1 hora y en una única etapa, adicionando, de manera secuencial, el volumen correspondiente de la disolución del estándar seguido del anticuerpo de detección biotinilado.

Para las metodologías basadas en el empleo de anticuerpos de detección modificados con biotina (FGFR4 e IL-8), tras la incubación del mismo y realizar tres lavados se lleva a cabo la etapa de marcaje enzimático mediante su incubación con Estrep-HRP durante 20 minutos.

- Procedimiento experimental empleando metodologías ELISA basadas en un formato indirecto para la determinación de autoanticuerpos específicos a la proteína p53 (p53-AAs)

El procedimiento experimental desarrollado para la determinación de p53-AAs en muestras de suero mediante un formato ELISA indirecto, en el que los pocillos se encuentran cubiertos con la proteína recombinante p53 purificada, consiste en la incubación, tras una etapa de lavado con la disolución reguladora de lavados durante 3 minutos siguiendo el procedimiento anterior, de la disolución del calibrador (o de la muestra de suero convenientemente diluida en el medio especificado por el fabricante), durante 1 hora. Transcurrida esta etapa, se realizan cinco lavados, se añade la disolución comercial del anticuerpo de detección conjugado a HRP (HRP-anti-IgG) y se incuban durante 1 hora para llevar a cabo el marcaje enzimático de los autoanticuerpos específicos a p53 capturados.

Para ambos formatos empleados, una vez finalizada la etapa de marcaje enzimático y realizar los lavados correspondientes, los pocillos modificados se incuban durante 20-30 minutos con 100 μ L del sustrato cromogénico TMB y se añaden 50 μ L de disolución de H_2SO_4 1 M preparada en agua desionizada para concluir la reacción enzimática y llevar a cabo la detección colorimétrica de los procesos de afinidad involucrados realizando medidas de absorbancia a 450 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte I.

Plataformas electroquímicas para la
determinación de biomarcadores de cáncer

Como se ha descrito a lo largo de la Introducción de esta Tesis Doctoral, el desarrollo de metodologías que permitan el cribado de firmas moleculares genéticas, proteicas y epigenéticas, es uno de los campos de investigación más prometedores para la detección temprana y fiable de los procesos cancerígenos, así como de su evolución y pronóstico.

Debido a la baja concentración en la que se encuentran la mayor parte de biomarcadores, especialmente en estadios tempranos de las neoplasias, las metodologías más demandadas por parte de la comunidad científica y médica requieren elevada sensibilidad, selectividad, fiabilidad, rapidez de respuesta y capacidad operacional en todo tipo de matrices biológicas. En este sentido, los grandes avances realizados en los últimos años en el campo de los biosensores electroquímicos han demostrado que estos dispositivos son capaces de satisfacer estos requisitos de manera eficiente, debido principalmente a la sinergia entre la sensibilidad que ofrecen las técnicas de detección electroquímica y la selectividad intrínseca característica de los receptores moleculares.

En esta sección se describirán y discutirán los aspectos más relevantes obtenidos en la determinación de biomarcadores circulantes de destacada relevancia asociados en los cánceres de mama y/o colon, principalmente, mediante el empleo de plataformas electroquímicas sencillas que satisfacen las demandas de la clínica actual y con aplicabilidad práctica demostrada en muestras clínicas de diversa procedencia.

Las metodologías desarrolladas en esta Tesis Doctoral se basan en el acoplamiento de MBs comerciales, empleadas como soportes para el desarrollo de las distintas estrategias de biosensado propuestas, receptores de afinidad de tipo proteico (anticuerpos, proteínas virales y proteínas funcionalizadas) y genético (sondas de DNA y RNA), y electrodos serigrafiados de carbono para detección individual o dual (SPCE o SPdCE, respectivamente) como transductores electroquímicos para la determinación de biomarcadores de relevancia emergente de diferente nivel molecular: proteínas circulantes, receptores extracelulares proteicos, autoanticuerpos y miRNAs.

El desarrollo de cada estrategia, aplicada a la determinación individual o multiplexada de las dianas seleccionadas, comprende la optimización de las variables experimentales que afectan al correcto funcionamiento de cada plataforma biosensora, la evaluación de su comportamiento analítico en términos de selectividad, sensibilidad y estabilidad operacional

para la determinación de los estándares correspondientes, y su aplicación real al análisis de muestras clínicas y fluidos biológicos de diversa procedencia.

En todos los casos, la obtención de la respuesta electroquímica se realizó tras la captura magnética de los bioconjugados preparados sobre las plataformas desechables mediante amperometría en disoluciones agitadas (a -0.20 V vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag) empleando el sistema HRP/H₂O₂/HQ.

4.1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN INDIVIDUAL DE BIOMARCADORES

En esta sección se describen y discuten los resultados obtenidos en la fabricación de las distintas plataformas de afinidad electroquímicas desarrolladas para la determinación individual de biomarcadores de naturaleza proteica (proteínas circulantes, receptores proteicos extracelulares y autoanticuerpos asociados a antígenos tumorales) y genética (miRNAs).

4.1.1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS INMUNOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES PROTEICOS DE RELEVANCIA EMERGENTE

Para la determinación de biomarcadores de naturaleza proteica se han desarrollado plataformas inmunosensoras basadas en la funcionalización conveniente de MBs comerciales con bio-receptores comerciales (anticuerpos convencionales o recombinantes (nanobodies) y proteínas fusionadas a HaloTag) y en el empleo de formatos de inmunoensayo apropiados (directo, sándwich o competitivo indirecto).

4.1.1.1. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO

En este apartado se discuten los resultados más relevantes del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Amperometric disposable magnetoimmunosensor for the determination of fibrinogen in plasma. Chemical Sensors 4 (2014) 7*, adjuntado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

El inmunosensor desarrollado para la determinación amperométrica de fibrinógeno (Fbg) y aplicado a la determinación en una muestra de plasma humano con un contenido certificado de Fbg, se basa en un formato competitivo indirecto en el que el Fbg libre presente en la muestra compite con el antígeno biotinilado (biotin-Fbg), previamente inmovilizado sobre partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Estrep-MBs), por los sitios de unión de un anticuerpo específico de Fbg conjugado con la enzima HRP (anti-Fbg-HRP), presente en concentración fija en disolución (**Figura 22**).

De acuerdo con el fundamento del formato de inmunoensayo competitivo indirecto, a medida que aumenta la concentración de Fbg libre en disolución se inmoviliza menos concentración de anti-Fbg-HRP sobre la superficie de las MBs modificadas y la respuesta amperométrica disminuye.

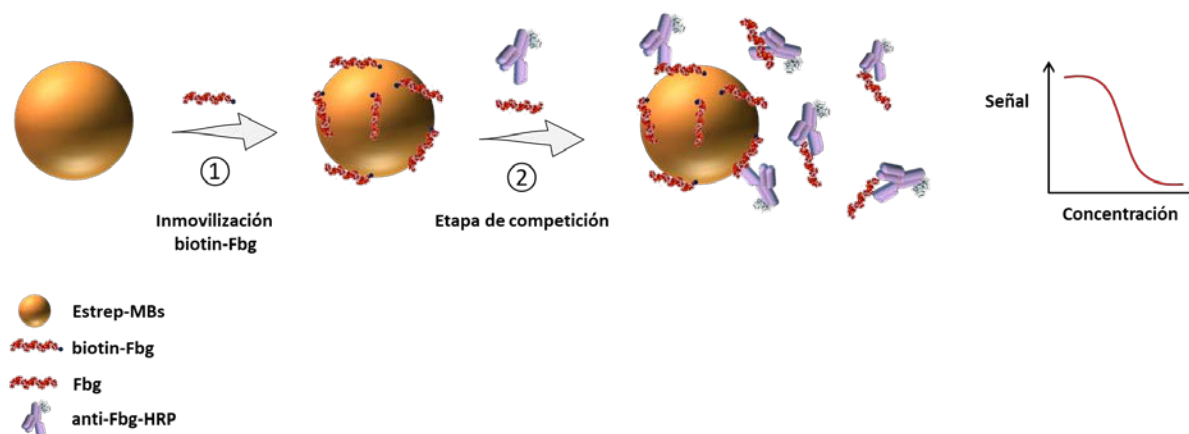


Figura 22: Esquema del procedimiento empleado en el desarrollo del inmunosensor para la determinación de Fbg basado en un formato competitivo indirecto que implica la modificación de Estrep-MBs con biotín-Fbg (1) y una etapa de competición entre el Fbg libre y el inmovilizado sobre las MBs por los sitios de unión de anti-Fbg-HRP (2).

4.1.1.1.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Con objeto de seleccionar el mejor protocolo para inmovilizar el antígeno, se prepararon bioconjugados magnéticos inmovilizando el antígeno sin modificar (Fbg) o modificado con biotina (biotín-Fbg) sobre la superficie de Estrep-MBs o HOOC-MBs, y se compararon las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de cada uno de los bioconjugados obtenidos con disoluciones que contenían una concentración fija de anti-Fbg-HRP.

Los resultados de la **Figura 23** demuestran que el reconocimiento efectivo de anti-Fbg-HRP, y por tanto la obtención de una mayor respuesta amperométrica, se produjo tras la inmovilización de biotín-Fbg sobre Estrep-MBs. La menor intensidad de corriente obtenida tras la inmovilización de Fbg sobre HOOC-MBs y Estrep-MB, y de biotín-Fbg sobre HOOC-MBs se debe a que, en ambos casos, la inmovilización del antígeno empleando la química de la EDC/Sulfo-NHS, ocurría a través de grupos $-NH_2$ presentes en la zona antigénica, impidiendo su reconocimiento efectivo por parte del anti-Fbg-HRP.

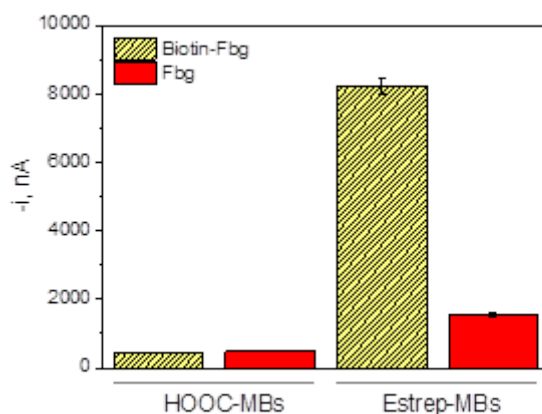


Figura 23: Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas tras la inmovilización de biotin-Fbg (barras rayadas) y Fbg (barras rojas) sobre HOOC-MBs y Estrep-MBs, y posterior incubación de las MBs modificadas con $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Tras seleccionar el modo de inmovilización que proporcionaba la mejor sensibilidad (biotin-Fbg sobre Estrep-MBs), se optimizaron el resto de las variables experimentales implicadas en la fabricación del inmunosensor propuesto, mediante la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (S_0) y en presencia ($S_{0.05}$) de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg para cada variable estudiada, seleccionando como valor óptimo el que proporcionaba una mayor relación $S_0/S_{0.05}$.

- Optimización del medio de preparación de disoluciones Fbg + anti-Fbg-HRP

El control de adsorciones inespecíficas en los procesos de inmuno-reconocimiento es fundamental para la obtención de resultados fiables libres de falsos positivos o negativos, debidos tanto al bloqueo inadecuado de la superficie sobre la que se desarrolla el inmunoensayo como a la presencia de anticuerpos heterofílicos o anti-animal humanos (HAMAS) [Güven, 2014].

La adsorción o interacción de proteínas en superficies sólidas puede producir ciertos cambios conformacionales en las mismas pudiendo causar su desnaturalización y/o pérdida de actividad. Estos procesos dependen de numerosas variables: tipo de superficie, estructura y concentración de la proteína, temperatura, pH, concentración iónica y composición del medio. Las fuerzas existentes entre proteínas y diversas superficies, de tipo

hidrofílico/hidrofóbico, fuerzas de *Van der Waals*, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas [Shedge, 2009], pueden controlarse mediante el ajuste del pH del medio, la adición al sistema de proteínas bloqueantes (como BSA o caseína) o de surfactantes (como Tween® 20), o suplementando los medios de preparación de las biomoléculas con una elevada concentración de NaCl, que es capaz de minimizar las interacciones iónicas entre las proteínas y la superficie [Tsumoto, 2007].

Con el objetivo de minimizar las adsorciones inespecíficas de anti-Fbg-HRP sobre la superficie de las Estrep-MBs, se compararon las intensidades de corriente obtenidas a -0.2 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag), tras la incubación de Estrep-MBs sin antígeno inmovilizado (biotin-Fbg) y de Estrep-MBs modificadas con $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de biotin-Fbg (Fbg-biotin-Estrep-MBs) con disoluciones de concentración fija de anti-Fbg-HRP, preparadas en disolución reguladora de PBS suplementada con Tween® 20 (PBST) o con 1 M de NaCl (PBS NaCl).

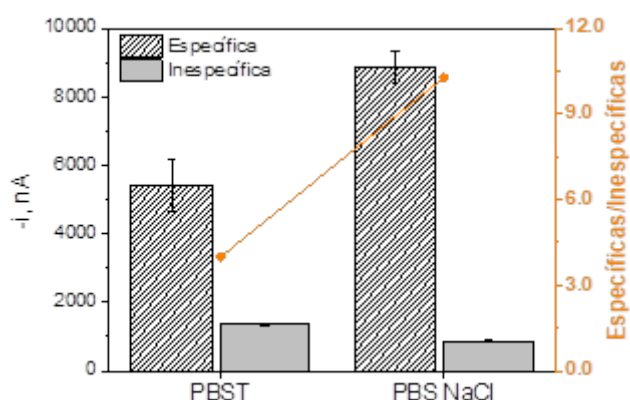


Figura 24: Respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de Estrep-MBs (barras grises, inespecíficas) y de Fbg-biotin-Estrep-MBs (barras rayadas, específicas) con $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP preparado en PBST o en PBS NaCl. $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (Espefíficas/Inespefíficas) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Como se observa en la **Figura 24**, el medio PBS NaCl proporcionaba las menores adsorciones inespecíficas del anti-Fbg-HRP sobre Estrep-MBs y favorecía el reconocimiento entre el anti-Fbg-HRP y el biotin-Fbg inmovilizado sobre la superficie de las MBs, obteniéndose una relación entre la respuesta específica e inespecífica significativamente

superior a la obtenida cuando la preparación se llevaba a cabo en PBST. A la vista de estos resultados, se seleccionó PBS NaCl como medio de preparación de las disoluciones mezcla de anti-Fbg-HRP y el antígeno libre.

- Optimización de la concentración de biotin-Fbg

El estudio de la concentración de biotin-Fbg se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor preparado a partir de Estrep-MBs modificadas con concentraciones de biotin-Fbg comprendidas entre 0.0–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tras su incubación, durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$, con disoluciones de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP sin suplementar (S_0) y suplementadas ($S_{0.05}$) con 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg. La variación de las respuestas amperométricas obtenidas (**Figura 25**), demostró el aumento de la relación $S_0/S_{0.05}$ con la concentración de biotin-Fbg inmovilizado hasta un valor de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir del cual la respuesta obtenida disminuía debido al impedimento estérico del reconocimiento del anticuerpo cuando se inmovilizan grandes cantidades de antígeno [Eletxigerra, 2016^a].

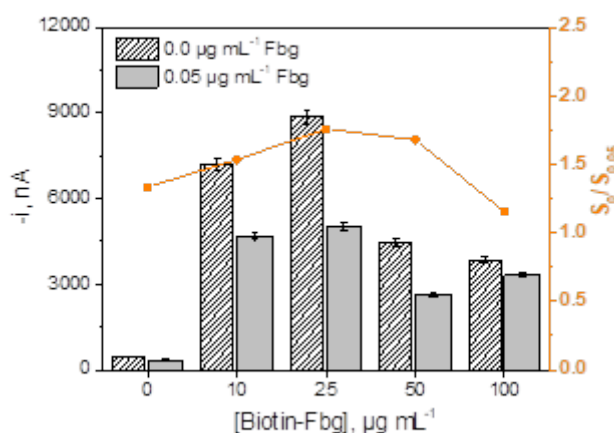


Figura 25: Respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores preparados a partir de Estrep-MBs modificadas con concentraciones crecientes de biotin-Fbg para 0.0 (barras rayadas, S_0) y 0.05 (barras grises, $S_{0.05}$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg en PBS NaCl suplementado con 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación ($S_0/S_{0.05}$) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

En la **Tabla 12** se resumen todas las variables experimentales optimizadas, incluyendo los rangos evaluados y la selección del valor óptimo para cada variable.

Tabla 12: Optimización de las variables experimentales involucradas en la preparación del inmunosensor amperométrico para la determinación de Fbg basado en un formato competitivo indirecto.

<i>Variable estudiada</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>Estrep-MBs, μg (μL)</i>	<i>30–50 (3.0–5.0)</i>	<i>50 (5.0)</i>
<i>[biotin-Fbg], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–100</i>	<i>25.0</i>
<i>[anti-Fbg-HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.5–1.0</i>	<i>0.5</i>
<i>Medio preparación $\text{Fbg} + \text{anti-Fbg-HRP}$</i>	<i>PBST, PBS NaCl</i>	<i>PBS NaCl</i>

4.1.1.1.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales más favorables para el desarrollo del inmunosensor propuesto, se evaluó su comportamiento analítico mediante la construcción de una curva de calibrado para estándares de Fbg preparados en disolución reguladora de PBS NaCl. La curva de calibrado obtenida, que refleja la tendencia característica de los ensayos de tipo competitivo, se muestra en la **Figura 26**.

La variación de la intensidad de corriente catódica en función del logaritmo de la concentración de Fbg libre se ajustó a una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros, de acuerdo con la expresión:

$$y = i_1 + \frac{i_2 - i_1}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot p}}$$

donde i_2 e i_1 representan la intensidad de corriente máxima y mínima obtenidas, IC_{50} es el valor de la concentración de Fbg que produce el 50 % de la señal amperométrica máxima, y p es la pendiente de Hill en el punto de inflexión de la sigmoide [Escamilla-Gómez, 2008].

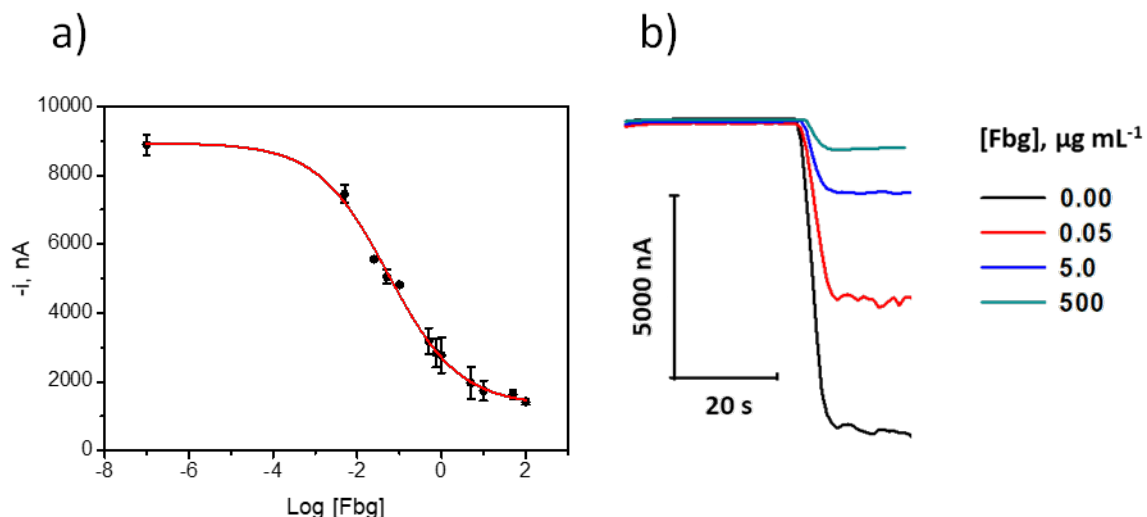


Figura 26: Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor desarrollado para estándares de Fbg preparados en disolución reguladora de PBS NaCl (a) y registros amperométricos obtenidos para distintas concentraciones de Fbg (b). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

Los valores para el LD y el rango lineal operacional obtenidos, correspondientes a 0.8 ng mL^{-1} y $4.0\text{--}799 \text{ ng mL}^{-1}$, fueron calculados como los valores de concentración de Fbg que producen una disminución de la señal amperométrica máxima del 10 %, y el intervalo de concentración para el que las respuestas obtenidas se corresponden con el 20 y 80 % de la señal máxima, respectivamente [Escamilla-Gómez, 2008]. Estos resultados, y el hecho de que el nivel de referencia plasmático para esta proteína se encuentre en un rango comprendido entre $1.5\text{--}4.0 \text{ mg mL}^{-1}$ [Lowe, 2004], confirman la aplicabilidad práctica del inmunosensor desarrollado para la determinación de este biomarcador a los niveles clínicamente relevantes, tras una dilución apropiada de la muestra.

Las características analíticas obtenidas con el inmunosensor desarrollado se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13: Resumen de las características analíticas obtenidas con el inmunosensor desarrollado para la determinación de estándares de Fbg preparados en PBS NaCl.

<i>Característica analítica</i>	<i>Valor</i>
<i>DR, ng mL⁻¹</i>	<i>4.0–799</i>
<i>r</i>	<i>0.997</i>
<i>IC₅₀, ng mL⁻¹</i>	<i>54</i>
<i>LD, ng mL⁻¹</i>	<i>0.8</i>

El valor de la desviación estándar relativa (RSD) obtenido entre las medidas amperométricas registradas con 10 inmunosensores diferentes preparados el mismo día y de la misma manera, para estándares de 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg, de un 3.0 %, confirmó la reproducibilidad y robustez en los procesos de modificación, captura de las MBs sobre la superficie del transductor electroquímico, y obtención de respuestas amperométricas, implicados en la preparación y determinación con los inmunosensores desarrollados.

También se evaluó la estabilidad con el tiempo de los bioconjugados Fbg-biotin-Estrep-MBs (antes de realizar la determinación) y HRP-anti-Fbg-Fbg-biotin-Estrep-MBs (después de realizar la determinación) comparando las respuestas amperométricas obtenidas con estos bioconjugados cada día de control, preparados y almacenados a 4 °C en PBST filtrado. La estabilidad de las Fbg-biotin-Estrep-MBs se evaluó tras su incubación con la disolución de anti-Fbg-HRP en ausencia de Fbg libre. El gráfico de control obtenido para ambos tipos de bioconjugados (**Figura 27**) indica la obtención de respuestas dentro de los límites de control, calculados como $\pm 3s$, siendo s la desviación estándar de la intensidad de corriente obtenida con 9 inmunosensores distintos, fabricados de la misma manera, el día de preparación de los bioconjugados (primer día del estudio), durante al menos los 50 días posteriores a su fabricación (no se evaluaron tiempos superiores). Estos resultados confirman la elevada estabilidad de las biotin-Fbg-Estrep-MBs y HRP-anti-Fbg-Fbg-biotin-Estrep-MBs, que pueden ser preparadas con antelación hasta que sea preciso llevar a cabo el análisis de muestra (biotin-Fbg-Estrep-MBs) o utilizados para la determinación y almacenados hasta que sea posible realizar la medida electroquímica (HRP-anti-Fbg-Fbg-biotin-Estrep-MBs).

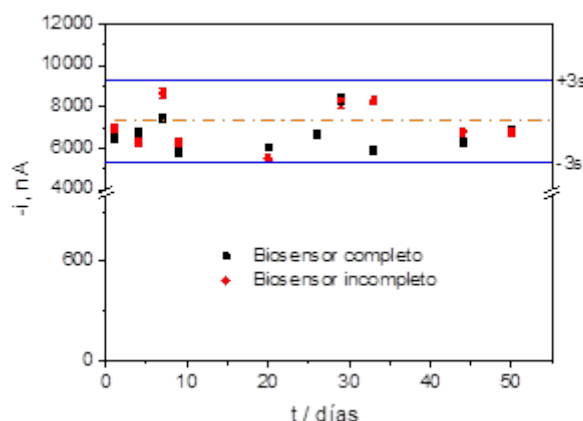


Figura 27: Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de los bioconjugados Fbg-biotin-Estrep-MBs (●) y HRP-anti-Fbg-Fbg-biotin-Estrep-MBs (●), preparados y almacenados a 4 °C en PBST filtrado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de Fbg libre y tras la incubación de los bioconjugados Fbg-biotin-Estrep-MBs con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-Fbg-HRP. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4.1.1.1.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Con vistas a su aplicabilidad práctica, se evaluó la selectividad del inmunosensor desarrollado comparando las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 y $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg preparados en ausencia y en presencia de diversos interferentes que pueden encontrarse con la proteína diana, a las concentraciones evaluadas, en las muestras de suero y plasma a analizar: dímero-D, BSA, EDTA, IgG humana, hemoglobina y heparina (**Figura 28**).

Mientras que en presencia de BSA y EDTA la relación $S_0/S_{0.05}$ resultó similar a la obtenida en ausencia de interferentes, las intensidades de corriente obtenidas en presencia de dímero-D, heparina, IgG humana y hemoglobina resultaron significativamente diferentes en comparación con las registradas en ausencia de los mismos, sin embargo, es importante resaltar que, como se demostrará en apartados posteriores, fue posible llevar a cabo la detección fiable de Fbg en la muestra seleccionada.

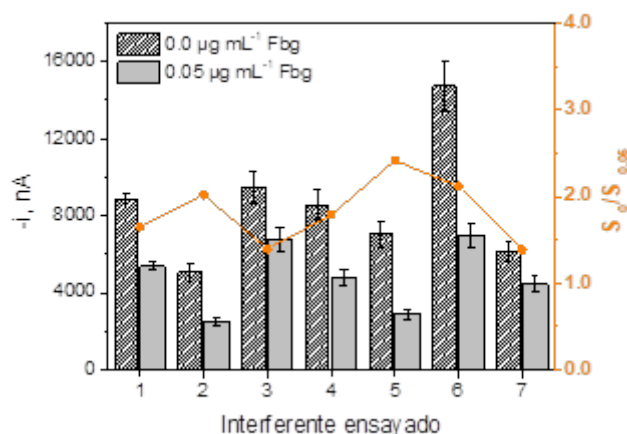


Figura 28: Estudio de selectividad del inmunosensor desarrollado para Fbg. Respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (barras rayadas, S_0) y 0.05 (barras grises, $S_{0.05}$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Fbg preparados en PBS NaCl (1) y en PBS NaCl conteniendo: $5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ dímero-D (2); $5.4 \times 10^4 \mu\text{g mL}^{-1}$ BSA (3); $1.0 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ EDTA (4); $37.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ IgG humana (5); $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ hemoglobina (6) y $4.0 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ heparina (7). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación ($S_0/S_{0.05}$) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

La disminución en las intensidades de corriente obtenidas en presencia de dímero-D y heparina pueden atribuirse a la similitud que existe entre la estructura del dímero-D y Fbg [Wang, 2012], lo que dificulta el reconocimiento efectivo del Fbg por parte de anti-Fbg-HRP, y a la ralentización de los procesos de reconocimiento Ag–Ab en muestras de plasma heparinizadas [Bowen, 2014], respectivamente.

La interferencia observada en presencia de IgG humana (barras 5) puede relacionarse con los errores significativos observados en los inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón (como el anticuerpo de detección utilizado en el inmunosensor desarrollado), atribuibles a la presencia de anticuerpos humanos circulantes reactivos con proteínas animales (anticuerpos anti-animales humanos, HAAA) [Kricka, 1999], [Bjerner, 2005], [Melanson, 2007], [Tate, 2004]. Los HAAA más comunes que interfieren son los anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA). Estas HAMAs son típicamente IgGs y reconocen epítopos en la porción Fc de inmunoglobulinas extrañas [Kricka, 1999]. Así, las respuestas amperométricas inferiores obtenidas en este caso particular podrían atribuirse a una unión preferencial de los HAMAs con el anti-Fbg-HRP, lo que dificultaría su unión al antígeno diana. Sin embargo, es importante destacar que, además de que se encuentran disponibles disoluciones comerciales para eliminar eficientemente las IgGs del suero [Torrente-

Rodríguez, 2017], dada la excelente sensibilidad del inmunosensor desarrollado, la gran dilución que habría que aplicar a la muestra de suero para realizar la determinación asegura que esta interferencia resulte despreciable.

Finalmente, la actividad de tipo peroxidasa que muestra la hemoglobina, ampliamente descrita en bibliografía **[Smith, 1967]**, **[Kapralov, 2009]**, explica el aumento en la señal amperométrica obtenida con el inmunosensor desarrollado en su presencia (barras 6).

En cuanto a la selectividad de la metodología, es importante mencionar que, teniendo en cuenta los niveles normales de Fbg en plasma y las características analíticas alcanzadas con el inmunosensor desarrollado, la determinación de Fbg en este tipo de muestra requiere una dilución previa de la misma de ~60000 veces. Por otro lado, considerando que los niveles basales plasmáticos de IgG y hemoglobina se encuentran en rangos comprendidos entre 6.7–15.5 mg mL⁻¹ **[Li, 2002]** y 1.6–5.8 µg mL⁻¹ **[Anderson, 1963]**, respectivamente, es de esperar la ausencia total de interferencia por parte de ambas especies en el análisis de Fbg en las muestras diluidas.

4.1.1.1.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO

Con el fin de demostrar la utilidad práctica del inmunosensor desarrollado, se analizó una muestra de plasma humano conteniendo una concentración certificada de Fbg de 2.7 mg mL⁻¹.

En primer lugar, se evaluó la posible existencia de efecto matriz comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de las Fbg-biotin-Estrep-MBs en la muestra de plasma convenientemente diluida con PBS NaCl, conteniendo 0.005, 0.05 y 0.5 µg mL⁻¹ de Fbg, respectivamente, bajo las condiciones experimentales previamente optimizadas.

Debido a la ausencia de diferencias significativas en los valores medios de la intensidad de corriente obtenida para estándares preparados en la matriz de la muestra y en el medio regulador PBS NaCl, a un nivel de confianza $\alpha = 0.05$ según el test estadístico de Student ($t_{\text{cal}} = 0.267$; $t_{\text{tab}} = 2.76$), la determinación de Fbg en la muestra de plasma diluida 54000 veces se llevó a cabo mediante interpolación de las intensidades de corriente obtenidas en la curva de calibrado para estándares de Fbg preparados en PBS NaCl, representada en la **Figura 26**.

Siguiendo este procedimiento, la determinación de Fbg en seis alícuotas del material de referencia proporcionó un contenido medio de Fbg de $(2.8 \pm 0.2 \text{ mg mL}^{-1})$, un valor de RSD de 5.9 %, y un porcentaje de recuperación de $(103 \pm 6) \%$. La comparación estadística de estos resultados, de acuerdo al test de Student, con el valor certificado, proporcionó unos valores para t_{cal} y t_{tab} de 1.488 y 2.571, respectivamente, lo que confirmó la ausencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el inmunosensor desarrollado y el valor certificado para un nivel de confianza del 95 %, y por tanto, demuestra la fiabilidad del mismo para la determinación de Fbg en muestras de plasma humano de acuerdo con el protocolo descrito.

4.1.1.2. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ENDOGLINA (CD105)

En este apartado se describen los resultados más importantes del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Rapid endoglin determination in serum samples using an amperometric magneto-actuated disposable immunosensing platform. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 129 (2016) 288–293*, cuyo original publicado se presenta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Durante esta Tesis Doctoral también se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico para la determinación de endogлина (CD105) en muestras reales de suero, basado en una configuración tipo sándwich implementada sobre HOOC-MBs empleando una pareja de anticuerpos específicos que reconocen regiones distintas del antígeno, uno de ellos conjugado con la enzima HRP (anti-CD105 y anti-CD105-HRP, respectivamente).

En esta configuración, el anticuerpo de captura (anti-CD105) se inmovilizaba covalentemente tras activar los grupos carboxilo de las MBs con disoluciones mezcla de EDC y Sulfo-NHS. Tras la inmovilización del anticuerpo de captura y una etapa de bloqueo con etanolamina de los grupos residuales activados, se llevó a cabo, en una única etapa, la captura y el marcaje enzimático de la proteína diana sobre los inmunoconjugados resultantes. De acuerdo con el formato de ensayo empleado, la respuesta amperométrica, obtenida en presencia del sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$ tras capturar los bioconjugados magnéticos resultantes sobre la superficie de los SPCEs, aumentaba con la concentración de CD105. El fundamento de la estrategia desarrollada se esquematiza en la **Figura 29**.

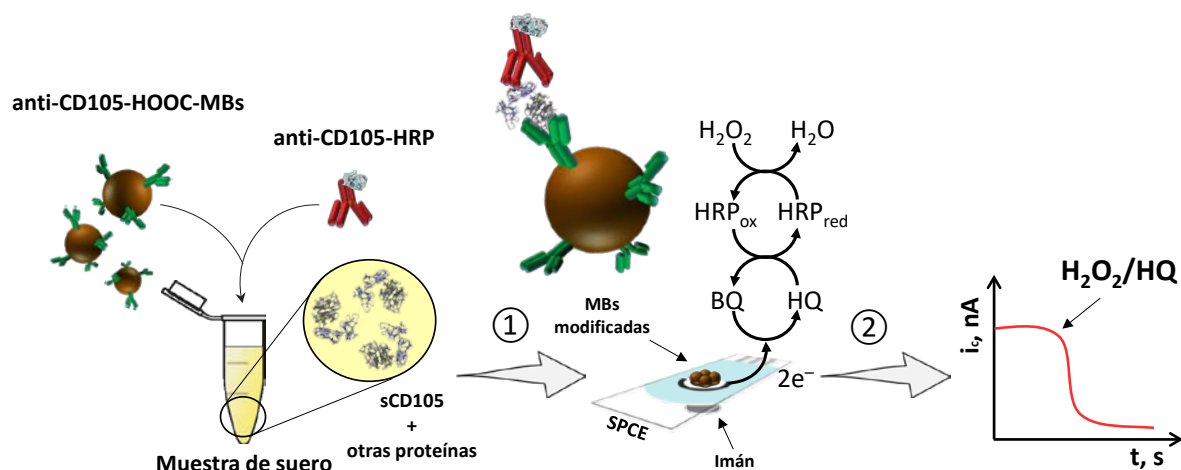


Figura 29: Representación esquemática del inmunosensor desarrollado para la determinación de CD105 en muestras de suero. Una vez modificadas, las MBs se depositan sobre la superficie del SPCE (1) y se lleva a cabo la transducción amperométrica (2) de acuerdo con la secuencia de reacciones que se muestra.

La viabilidad de la metodología propuesta se demostró comparando las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de HOOC-MBs (sin anti-CD105 inmovilizado) y anti-CD105-MBs con disoluciones estándar de 0.0 (B) y 10.0 (S) $ng\ mL^{-1}$ de CD105 suplementadas con anti-CD105-HRP.

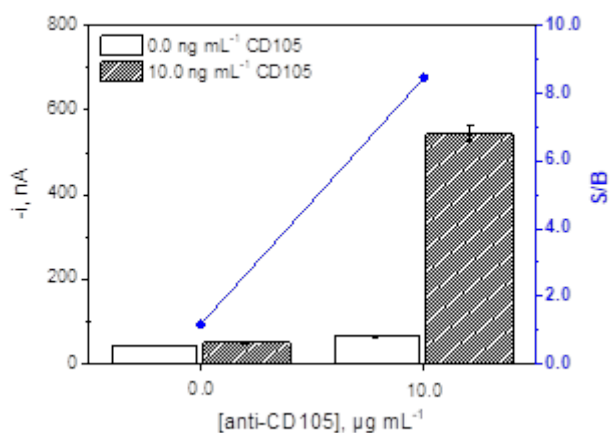


Figura 30: Respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado sobre HOOC-MBs sin modificar y modificadas con 10.0 $\mu g\ mL^{-1}$ de anti-CD105 (anti-CD105-MBs), en presencia de 0.0 (barras blancas, B) y 10.0 (barras rayadas, S) $ng\ mL^{-1}$ de estándares de CD105. $E_{app} = -0.2\ V$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Los resultados obtenidos (**Figura 30**) confirmaron la ausencia de adsorciones inespecíficas de CD105 y anti-CD105-HRP sobre las MBs sin modificar, obteniéndose una relación S/B en presencia de las anti-CD105-MBs 7.2 veces superior a la obtenida sobre las HOOC-MBs sin modificar. Estos resultados confirman que la respuesta que proporciona el inmunosensor desarrollado se debe únicamente a la reacción de reconocimiento del biomarcador por parte de sus anticuerpos específicos y que realmente se están formando inmunocomplejos tipo sándwich sobre la superficie de las MBs.

4.1.1.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

De nuevo, y con objeto de desarrollar un inmunosensor que proporcione la mayor sensibilidad empleando el protocolo más sencillo y el menor tiempo de ensayo, se estudió la influencia de todas las variables experimentales que influyen en el funcionamiento de la estrategia propuesta, tomando como criterio de selección la dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas a -0.20 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag) para estándares de 0.0 (B) y 10.0 (S) ng mL^{-1} de CD105 y la relación S/B resultante.

A modo de ejemplo se presentan a continuación los resultados experimentales obtenidos en las optimizaciones de las concentraciones de ambos anticuerpos y del número de etapas involucradas en la fabricación del inmunosensor.

- Optimización de la concentración de anti-CD105 y anti-CD105-HRP

La optimización de la concentración de los anticuerpos involucrados en la estrategia tipo sándwich desarrollada, se llevó a cabo comparando las señales amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (B) y 10.0 (S) ng mL^{-1} de CD105 con inmunosensores preparados empleando concentraciones de anti-CD105 y de anti-CD105-HRP comprendidas entre 0.0 – 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.0 – 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (**Figura 31**).

Los resultados de las **Figura 31a** y **31b** muestran la mayor relación S/B obtenida para concentraciones de anti-CD105 y anti-CD105-HRP de 25.0 y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, como compromiso entre sensibilidad y coste de ensayo, se optó por seleccionar una concentración de 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-CD105.

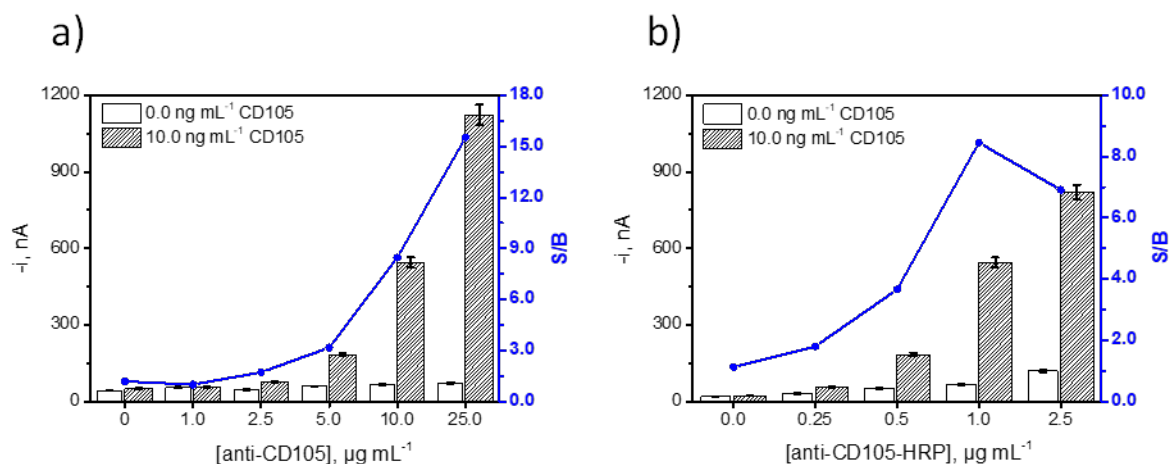


Figura 31: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores fabricados variando la concentración de anti-CD105 inmovilizado sobre HOOC-MBs (a) y de anti-CD105-HRP (b) para disoluciones estándares que contenían 0.0 (barras blancas, B) y 10.0 (barras rayadas, S) ng mL⁻¹ de CD105. $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

- Evaluación del número de etapas

Teniendo en cuenta la sencillez y el reducido tiempo de ensayo que demanda la clínica actual, se evaluó la influencia del número de etapas involucradas en la fabricación del inmunosensor propuesto en la sensibilidad que proporciona.

Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (B) y 10.0 (S) ng mL⁻¹ de CD105 realizando los procesos de captura y marcaje enzimático de CD105 sobre las anti-CD105-MBs, una vez bloqueadas, en una misma etapa o en dos etapas sucesivas. En el ensayo basado en dos etapas secuenciales, las anti-CD105-MBs se incubaron, durante 30 minutos a 25 °C, con disoluciones estándares de 0.0 y 10.0 ng mL⁻¹ de CD105 (preparadas en PBST) y, posteriormente, se llevó a cabo el marcaje enzimático de los conjugados CD105-anti-CD105-MBs obtenidos, con disoluciones de anti-CD105-HRP (preparado en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v)) en la concentración óptima, durante 30 minutos a la misma temperatura. En el protocolo basado en una única etapa, las anti-CD105-MBs se incubaban con disoluciones de estándares de 0.0 y 10.0 ng mL⁻¹ de CD105 suplementadas con anti-CD105-HRP (preparadas en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v)) durante 30 minutos a 25 °C.

La comparación de las respuestas amperométricas obtenidas (**Figura 32**) demuestra que el protocolo basado en una única etapa de incubación proporcionaba la mayor relación S/B, siendo este comportamiento coincidente con el observado en otros inmunosensores basados en una configuración de tipo sándwich [Kaçar, 2015], atribuible a un menor impedimento estérico y a una mayor efectividad en el proceso de reconocimiento del antígeno cuando ambas especies se encuentran libres en disolución.

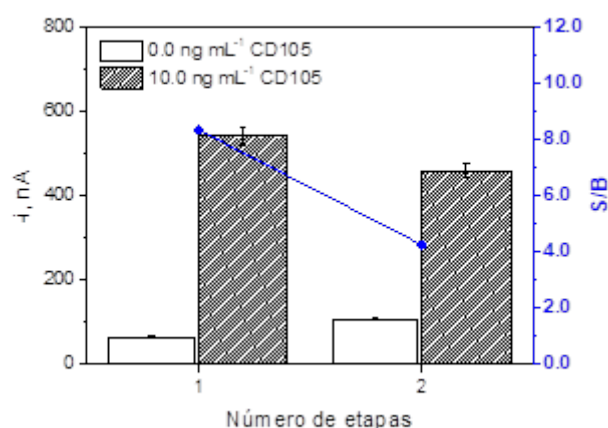


Figura 32: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado en función del número de etapas necesarias para su preparación, tras la modificación y bloqueo de las anti-CD105-MBs en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras rayadas, S) de 10.0 ng mL⁻¹ de CD105. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

La **Tabla 14** resume el conjunto de variables experimentales optimizadas para el desarrollo del inmunosensor amperométrico para la determinación de CD105.

Tabla 14: Optimización de las distintas variables experimentales involucradas en la fabricación del inmunosensor amperométrico tipo sándwich desarrollado para la determinación de CD105.

Variable estudiada	Rango evaluado	Valor seleccionado
HOOC-MBs, μg (μL)	20–60 (2.0–6.0)	30 (3.0)
[anti-CD105], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.0–25.0	10.0
$t_{\text{incubación anti-CD105}}$, min	15–60	15
[anti-CD105-HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.0–2.5	1.0
Número de etapas	1–2	1
$t_{\text{incubación CD105 + anti-CD105-HRP}}$, min	15–60	30

4.1.1.2.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para su fabricación, se caracterizó el comportamiento analítico del inmunosensor desarrollado construyendo una curva de calibrado en presencia de disoluciones de estándares de CD105 de concentración creciente, preparadas en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v).

La curva de calibrado obtenida, mostrada en la **Figura 33**, demuestra la dependencia lineal existente entre las respuestas amperométricas proporcionadas por el inmunosensor y la concentración del biomarcador diana, en el rango de concentración comprendido entre 0.8–10.0 ng mL⁻¹ ($r = 0.996$), con una pendiente de (48 ± 1) nA ng⁻¹ mL y una ordenada en el origen de (58 ± 6) nA. En las condiciones optimizadas se obtuvieron valores para los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de 0.2 y 0.8 ng mL⁻¹, respectivamente, estimados de acuerdo a los criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, siendo s_b la desviación estándar de 10 valores de intensidad de corriente obtenidas en ausencia de CD105, y m el valor de la pendiente del calibrado obtenido para estándares de CD105.

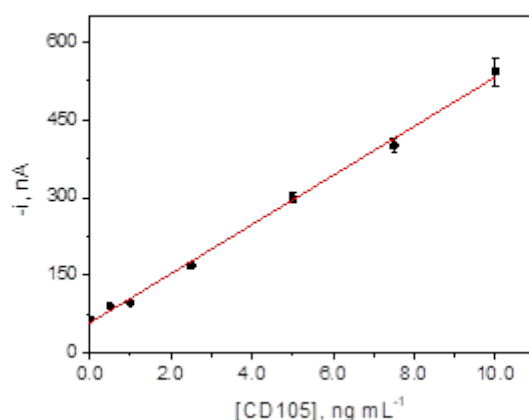


Figura 33: Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor desarrollado para estándares de CD105 preparados en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Es importante destacar que el LD obtenido resultó 4.5 veces inferior al del único inmunosensor electroquímico descrito en literatura hasta la fecha de realización de este trabajo para la determinación de CD105 [Zeng, 2012], que además requería un protocolo de preparación de 30 horas.

La reproducibilidad de las medidas amperométricas, así como del proceso de modificación de las MBs y su captura magnética sobre la superficie de los transductores electroquímicos, se evaluó comparando las respuestas obtenidas con 10 inmunosensores diferentes preparados de la misma forma, para disoluciones de estándares de CD105 de 5.0 ng mL⁻¹. El valor de RSD obtenido (3.6 %) confirmó la robustez y reproducibilidad de todos los protocolos empleados.

La estabilidad con el tiempo de los conjugados anti-CD105-MBs preparados y almacenados a 4 °C en disolución reguladora de PBS filtrada, se evaluó comparando las respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores preparados cada día de control a partir de las anti-CD105-MBs para estándares de CD105 de 0.0 y 5.0 ng mL⁻¹. Los resultados obtenidos (no mostrados) demostraron que las respuestas para ambas concentraciones de estándares permanecían dentro de los límites de control (establecidos como $\pm 3s$, siendo s la desviación estándar de las respuestas obtenidas para cada estándar con 10 inmunosensores diferentes fabricados el día de preparación de las anti-CD105-MBs) durante al menos 30 días (tiempo máximo ensayado), lo que garantiza la determinación del biomarcador de interés sin pérdida significativa de sensibilidad durante este periodo.

4.1.1.2.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Con el fin de evaluar la selectividad que ofrecía el inmunosensor desarrollado para la determinación fiable de CD105 en presencia de otras especies proteicas con las que puede coexistir en muestras de suero, se compararon las intensidades de corriente registradas para estándares de 0.0 y 5.0 ng mL⁻¹ de CD105, preparados en ausencia y en presencia de cada una de ellas, al mismo nivel de concentración que CD105 o al que suelen encontrarse en este tipo de matrices biológicas.

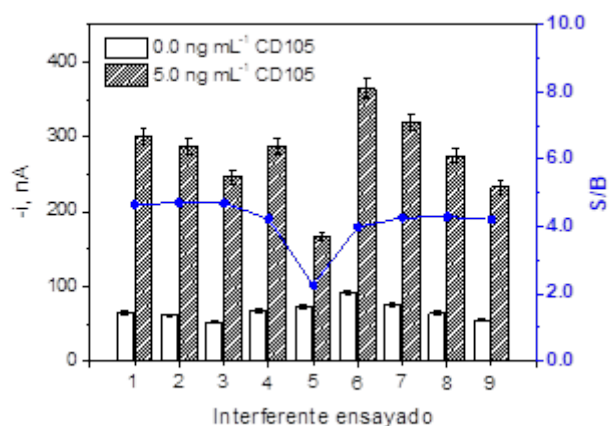


Figura 34: Estudio de selectividad del inmunosensor desarrollado para CD105. Respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones estándar de 0.0 (barras blancas, B) y 5.0 ng mL⁻¹ de CD105 preparadas en disolución bloqueante de caseína al 1% (p/v) (barras rayadas, S) en ausencia (1) y en presencia de: 5.0 ng mL⁻¹ HER-2 (2); 10.0 ng mL⁻¹ TNF (3); 5.0 mg mL⁻¹ BSA (4); 1.0 mg mL⁻¹ IgG humana (5); 5.0 mg mL⁻¹ hemoglobina (6); 200 ng mL⁻¹ p53 (7); 5.0 ng mL⁻¹ PR (8) y 5.0 ng mL⁻¹ ERα (9). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Como muestra la **Figura 34**, tan solo se observó una interferencia significativa en la determinación de CD105 en presencia de IgG humana, discutida en el Apdo. 4.1.1.1.3 de esta Tesis Doctoral. Cabe destacar de nuevo en este punto que, además de las alternativas comerciales de las que se dispone para minimizar esta interferencia de forma eficiente, tal y como se demuestra en el próximo apartado, esta interferencia no supuso un problema para la determinación fiable del contenido endógeno de CD105 en muestras de suero humano.

4.1.1.2.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO HUMANO

Teniendo en cuenta el papel relevante que juega este biomarcador en los procesos de angiogénesis (comentado en detalle en el Apdo. 2.3.1.2 de esta Tesis Doctoral), a su vez tremendamente relacionados, entre otras patologías de gran relevancia, con el crecimiento de tumores y el desarrollo de artritis reumatoide, se evaluó la aplicabilidad de este inmunosensor para la determinación del contenido endógeno de CD105 en muestras de suero de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide proporcionadas por el Hospital Fundación Jiménez Díaz.

La comparación estadística entre las pendientes del calibrado obtenido para estándares de CD105 ($(48 \pm 1) \text{ nA ng}^{-1} \text{ mL}$) y el realizado en muestras de suero convenientemente diluidas 2 o 5 veces con solución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) y suplementadas con concentraciones de estándares de CD105 hasta un nivel de 5.0 ng mL^{-1} ($(51 \pm 2) \text{ nA ng}^{-1} \text{ mL}$), demostraron la ausencia de efecto matriz. Estos resultados permitieron llevar a cabo la determinación fiable de CD105 en las muestras de suero diluidas por simple interpolación de las respuestas amperométricas que proporcionan, en la curva de calibrado obtenida para estándares de CD105 mostrada en la **Figura 33**.

Como demuestran los resultados obtenidos (mostrados en la **Tabla 15**), las concentraciones determinadas fueron en todos los casos superiores al nivel normal descrito para esta proteína en suero de individuos sanos (9.2 ng mL^{-1}) [Hasheesh, 2010], lo que confirma la hiperexpresión de este biomarcador en individuos diagnosticados con artritis reumatoide, y por tanto, la utilidad del inmunosensor desarrollado y del biomarcador empleado para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad mediante el análisis en muestras de suero.

La comparación de los resultados proporcionados por el inmunosensor desarrollado y por un kit espectrofotométrico comercial ELISA basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos (datos en **Tabla 15**), demuestra la ausencia de diferencias significativas entre ambos métodos para un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$ en el análisis de este tipo de muestras.

Tabla 15: Determinación del contenido endógeno de CD105 (expresado en ng mL^{-1}) en muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide empleando el inmunosensor desarrollado y un kit espectrofotométrico comercial ELISA basado en los mismos inmunoreactivos.

<i>Muestra de suero</i>	<i>Inmunosensor amperométrico</i>	<i>Método ELISA espectrofotométrico</i>
1	(10.4 ± 1.6) ; $RSD_{n=3} = 6.2 \%$	(10.6 ± 1.3) ; $RSD_{n=3} = 5.0 \%$
2	(17.8 ± 1.1) ; $RSD_{n=3} = 2.4 \%$	(18.2 ± 1.1) ; $RSD_{n=3} = 2.5 \%$
3	(10.5 ± 1.2) ; $RSD_{n=3} = 4.6 \%$	(11.0 ± 1.0) ; $RSD_{n=3} = 3.6 \%$
4	(10.5 ± 0.8) ; $RSD_{n=3} = 2.9 \%$	(9.8 ± 1.2) ; $RSD_{n=3} = 4.7 \%$

Es importante destacar que, en comparación con la metodología ELISA, comúnmente empleada para la determinación de este biomarcador [Abdelwahab, 2017], [Oggè, 2010], [Li, 2000], el inmunosensor desarrollado permite realizar la determinación a niveles clínicos relevantes y ofrece un LD similar (5.0 vs. 3.1 pmol), pero en un tiempo de ensayo 7 veces inferior, al del método espectrofotométrico. Además, la simplicidad del procedimiento operativo, el coste asequible, la compatibilidad con miniaturización de la instrumentación requerida, y el sencillo acoplamiento de la estrategia desarrollada en plataformas de multiplexado, hacen que resulte muy competitiva frente a la metodología convencional para la determinación de este biomarcador de relevancia en la rutina hospitalaria.

4.1.1.3. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR 4 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFR4)

Los resultados de este apartado recogen los aspectos más relevantes publicados en el artículo *Torrente-Rodríguez et al. Electrochemical sensor for rapid determination of fibroblast growth factor receptor 4 in raw cancer cell lysates. PLoS One 12 (2017): e0175056*, que se adjunta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

A pesar de la enorme relevancia biológica, clínica y oncológica de los factores de crecimiento de fibroblastos y de sus receptores tirosina quinasa (FGFRs) cuya desregulación ejerce un efecto directo en el desarrollo de una gran variedad de neoplasias, hasta el momento de comenzar este trabajo no se había descrito en la literatura ningún biosensor electroquímico para la determinación de este tipo de biomarcadores.

Así, teniendo en cuenta el papel fundamental que juegan los factores de crecimiento en los aspectos patológicos asociados con el cáncer y otras enfermedades de relevancia, se ha desarrollado por primera vez un inmunosensor amperométrico para la determinación del receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4) en lisados celulares, basado en un formato de ensayo tipo sándwich, empleando anticuerpos específicos de captura (anti-FGFR4) y de detección biotinilados (b-anti-FGFR4), marcados con un conjugado enzimático de estreptavidina-HRP (Estrep-HRP) para la monitorización de las reacciones de reconocimiento Ag–Ab.

De manera análoga al inmunosensor discutido en el apartado anterior, tras la inmovilización covalente de anti-FGFR4 sobre la superficie de HOOC-MBs (previamente

activadas con una disolución mezcla de EDC/Sulfo-NHS) y su bloqueo posterior con etanolamina, se lleva a cabo la captura, el reconocimiento específico y el marcaje enzimático del biomarcador diana en una única etapa de incubación de 15 minutos, tal y como se esquematiza en la **Figura 35**.

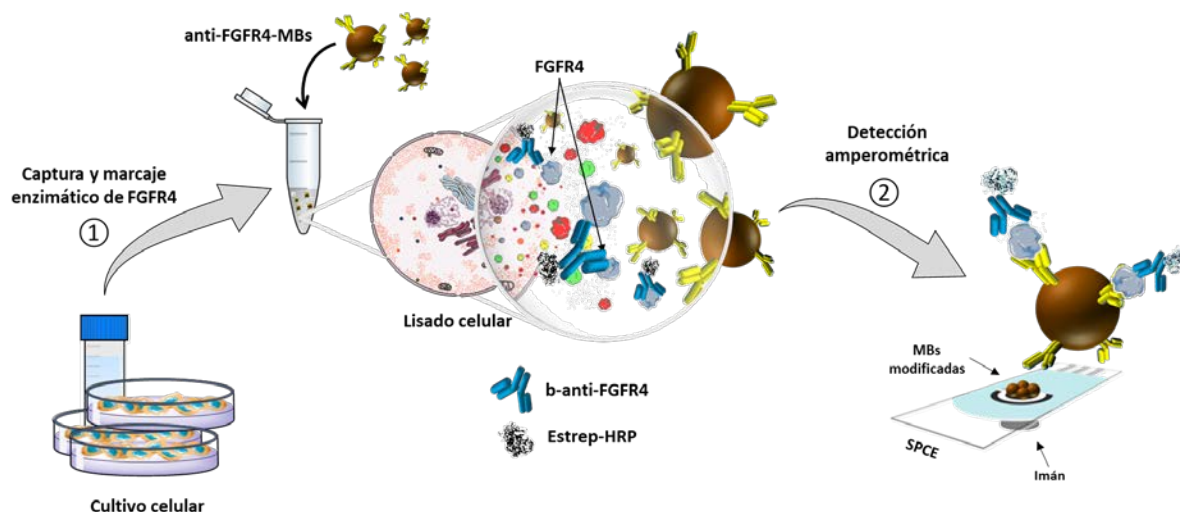


Figura 35: Representación esquemática del inmunosensor amperométrico desarrollado para la determinación de FGFR4 en lisados celulares basado en una configuración tipo sándwich sobre HOOC-MBs. Tras realizar la captura y el marcaje enzimático del biomarcador diana en una única etapa sobre las anti-FGFR4-MBs (1), éstas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un SPCE para llevar a cabo la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2/HQ (2).

La demostración de la fiabilidad de la estrategia desarrollada, así como de la eficiencia de la solución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) para la minimización de posibles adsorciones inespecíficas por parte de las especies que intervienen en la metodología, se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (B) y 10000 (S) $pg\ mL^{-1}$ de FGFR4 sobre las HOOC-MBs sin modificar, y modificadas con anti-FGFR4.

Los resultados obtenidos (**Figura 36**) confirmaron la ausencia de adsorciones inespecíficas por parte de FGFR4, b-anti-FGFR4 y Estrep-HRP y, por tanto, que la respuesta proporcionada por el biosensor se debía exclusivamente al reconocimiento específico de FGFR4 por las anti-FGFR4-MBs, obteniéndose una relación S/B 16 veces superior a la obtenida sobre las MBs sin modificar.

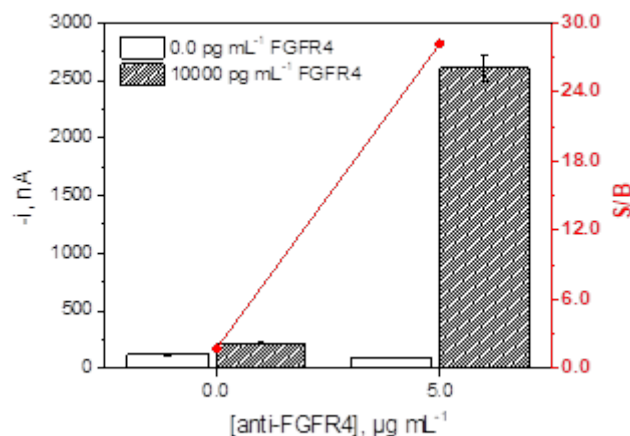


Figura 36: Respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores preparados a partir de HOOC-MBs modificadas con 0.0 y 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-FGFR4 para estándares que contenían 0.0 (barras blancas, B) y 10000 (barras rayadas, S) pg mL^{-1} de FGFR4. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.1.3.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Una vez comprobada la viabilidad del ensayo, se evaluaron las distintas variables experimentales que afectan al correcto funcionamiento de la metodología comparando, para cada variable estudiada, las respuestas amperométricas obtenidas a -0.20 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag), para estándares de 0.0 (B) y 5000 (S) pg mL^{-1} de FGFR4, y seleccionando como valor óptimo el que proporcionaba la mayor relación S/B en cada caso.

- Optimización de las concentraciones de anti-FGFR4 y b-anti-FGFR4

Se evaluó la influencia de las concentraciones de ambos anticuerpos en los rangos comprendidos entre 0.0–10.0 (anti-FGFR4) y 0.0–2.5 (b-anti-FGFR4) $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (**Figura 37**). Los resultados obtenidos, mostrados en la **Figura 37a**, indicaron el aumento de la relación S/B con la concentración de anti-FGFR4 hasta un valor de 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (como consecuencia del incremento de la intensidad de corriente obtenida en presencia de FGFR4), y una disminución para concentraciones superiores de anti-FGFR4 debido al aumento más significativo de la intensidad de corriente obtenida en ausencia de FGFR4.

En cuanto a la concentración de b-anti-FGFR4 (**Figura 37b**), se observó un aumento progresivo de la señal obtenida en presencia de FGFR4 hasta una concentración de b-anti-FGFR4 de $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor a partir del cual la señal específica (en presencia de 5000 pg mL^{-1} de FGFR4) se mantenía prácticamente constante mientras que la inespecífica (obtenida en ausencia de FGFR4) aumentaba considerablemente.

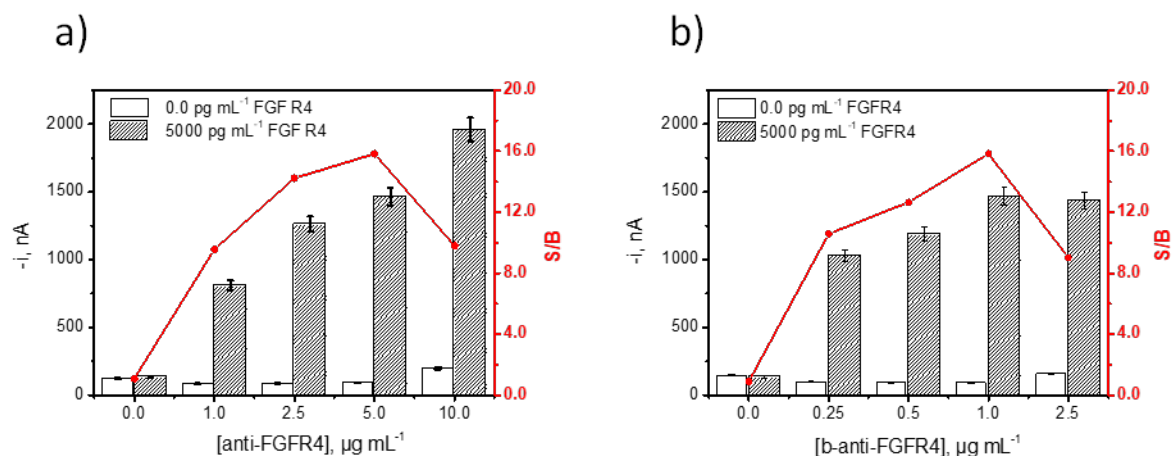


Figura 37: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores preparados a partir de concentraciones variables de anti-FGFR4 (a) y b-anti-FGFR4 (b) para estándares de 0.0 (barras blancas, B) y 5000 (barras rayadas, S) pg mL^{-1} de FGFR4. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron concentraciones de 5.0 y $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-FGFR4 y b-anti-FGFR4, respectivamente, para la fabricación de los inmunosensores.

- Evaluación del número de etapas

Con el objetivo de reducir el tiempo de ensayo y simplificar el procedimiento de fabricación del inmunosensor desarrollado, se evaluó la influencia del número de etapas involucradas en su preparación, comparando las señales amperométricas proporcionadas por inmunosensores fabricados a partir de anti-FGFR4-MBs empleando: (1) una etapa de incubación de 30 minutos con una disolución mezcla que contiene FGFR4, b-anti-FGFR4 y Estrep-HRP; 2 (A) dos etapas secuenciales de incubación de 30 minutos cada una, primero con una disolución que contiene FGFR4 y b-anti-FGFR4, y después con una disolución de Estrep-HRP; 2 (B) dos etapas secuenciales de incubación de 30 minutos cada una, primero con una

disolución de FGFR4, y después con una disolución mezcla que contiene b-anti-FGFR4 y Estrep-HRP, y (3) tres etapas secuenciales de incubación de 30 minutos cada una, con disoluciones de FGFR4, b-anti-FGFR4, y Estrep-HRP.

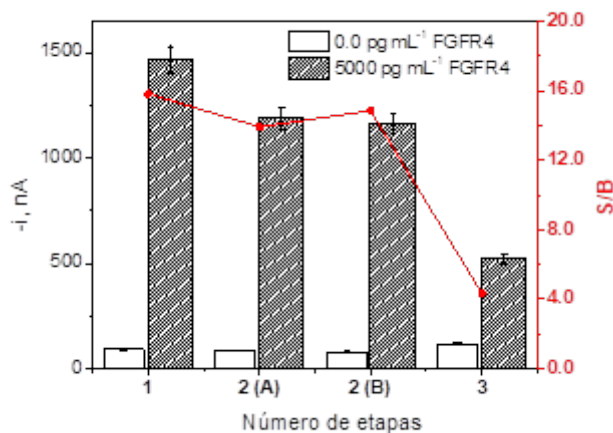


Figura 38: Respuestas amperométricas proporcionadas por los inmunosensores fabricados empleando diferentes etapas de acuerdo con los protocolos descritos, para estándares de 0.0 (barras blancas, B) y 5000 (barras rayadas, S) pg mL⁻¹ de FGFR4. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Los resultados representados en la **Figura 38** permiten concluir que el protocolo basado en una única etapa de incubación de las anti-FGFR4-MBs con una disolución mezcla que contenía FGFR4, b-anti-FGFR4 y Estrep-HRP, proporcionaba la mayor relación S/B, lo que confirma que trabajando con estos (inmuno)reactivos los procesos de reconocimiento y de marcaje enzimático ocurren de manera más efectiva cuando todas las especies se encuentran libres en disolución.

Tras seleccionar una única etapa de incubación para la preparación del inmunosensor y con vistas a disminuir el tiempo de ensayo, se evaluó la influencia de la duración de esta etapa de incubación en el intervalo comprendido entre 15–60 minutos. Los resultados obtenidos (no mostrados) demostraron una mayor relación S/B para 15 minutos, por lo que se seleccionó este tiempo de incubación como óptimo.

El conjunto de variables experimentales optimizadas, los rangos evaluados y los valores seleccionados en cada caso para el desarrollo del inmunosensor para la determinación de FGFR4, se recogen en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Resumen de las variables experimentales optimizadas para el desarrollo del inmunosensor amperométrico tipo sándwich para la determinación de FGFR4.

<i>Variable experimental</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>HOOC-MBs, μg (μL)</i>	<i>10–50 (1.0–5.0)</i>	<i>30 (3.0)</i>
<i>[anti-FGFR4], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–10.0</i>	<i>5.0</i>
<i>$t_{\text{incubación anti-FGFR4}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>15</i>
<i>[b-anti-FGFR4], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–2.5</i>	<i>1.0</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>1–3</i>	<i>1</i>
<i>$t_{\text{incubación FGFR4 + b-anti-FGFR4 + Estrep-HRP}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>15</i>
<i>Dilución Estrep-HRP</i>	<i>1: 5000–1:250</i>	<i>1:1000</i>

4.1.1.3.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

La curva de calibrado obtenida para estándares de FGFR4 (preparados en solución bloqueante de caseína al 1 % (p/v)) empleando inmunosensores fabricados bajo las condiciones seleccionadas, que se muestra en la **Figura 39**, refleja la dependencia lineal ($r = 0.999$) entre los valores de intensidad de corriente obtenidos y la concentración de estándares de FGFR4 en el rango de concentración comprendido entre 160.6 y 7500 pg mL^{-1} . Los valores para la pendiente, ordenada en el origen, y LD y LC, estimados de acuerdo con los criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, siendo s_b la desviación estándar de 10 medidas obtenidas en ausencia de FGFR4 y m la pendiente de la curva de calibrado para estándares del antígeno, resultaron de $(0.278 \pm 0.002) \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$, $(99 \pm 8) \text{ nA}$, 48.2 pg mL^{-1} y 160.6 pg mL^{-1} , respectivamente.

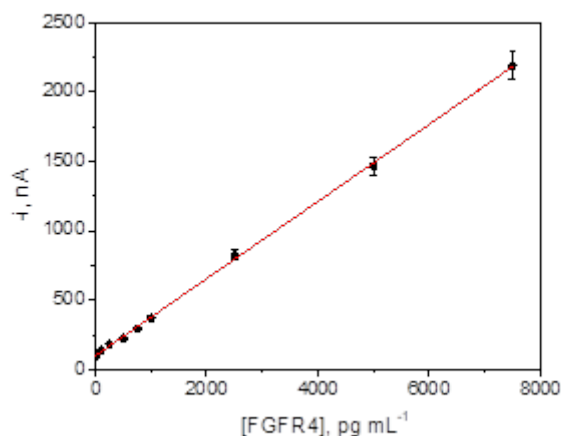


Figura 39: Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor desarrollado para estándares de FGFR4 preparados en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La excelente reproducibilidad de todos los protocolos involucrados en la determinación de FGFR4 con los inmunosensores desarrollados (modificación de MBs, captura magnética y transducción amperométrica sobre SPCEs), se demostró comparando las respuestas amperométricas proporcionadas por 6 inmunosensores diferentes preparados de la misma manera, para estándares de 2500 pg mL^{-1} de FGFR4, obteniéndose un valor de RSD de 4.4 %. Por otro lado, los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de almacenamiento de las anti-FGFR4-MBs (no mostrados), por comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 2500 pg mL^{-1} de estándares de FGFR4 para cada día de control cuando se almacenaban tras su preparación a 4°C en disolución reguladora de PBS filtrada, demostraron la obtención de valores de S/B dentro de los límites de control (estimados como en los inmunosensores descritos en apartados anteriores) durante dos semanas.

4.1.1.3.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

La selectividad del biosensor desarrollado frente a otras proteínas que pueden coexistir con el antígeno de interés en muestras donde resulta interesante su determinación, se evaluó en las condiciones experimentales previamente optimizadas, comparando las respuestas amperométricas obtenidas para 0.0 y 2500 pg mL^{-1} de estándares de FGFR4,

preparados en ausencia y en presencia de cada uno de los interferentes a las concentraciones a las que suelen encontrarse en muestras de suero humano.

Los resultados representados en la **Figura 40** muestran nuevamente que, de todas las especies evaluadas, solo la IgG humana interfirió significativamente (a los niveles ensayados) en la determinación de FGFR4. En el caso particular del receptor de interés, esta interferencia puede ser debida, además de a la presencia de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMAs), a factores estructurales del antígeno, que presenta una región de unión al ligando formado por tres dominios de tipo inmunoglobulina, denominados Ig I, Ig II e Ig III [Peláez García, 2013], desencadenando errores en inmunoensayos basados en una configuración de tipo sándwich que emplean anticuerpos monoclonales de ratón, debido a la reactividad cruzada entre el anticuerpo de captura y de detección, en ausencia del antígeno.

Cabe destacar que, como demuestran los resultados de la **Figura 40** (barras 6), además de que la determinación de FGFR4, aunque con menor sensibilidad, era posible incluso en presencia de una concentración de IgG 4×10^5 veces superior a la del receptor de interés, como se describirá en el apartado siguiente, esta interferencia no supone un problema en el tipo de muestra seleccionada (lisados de células cancerígenas) para demostrar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado.

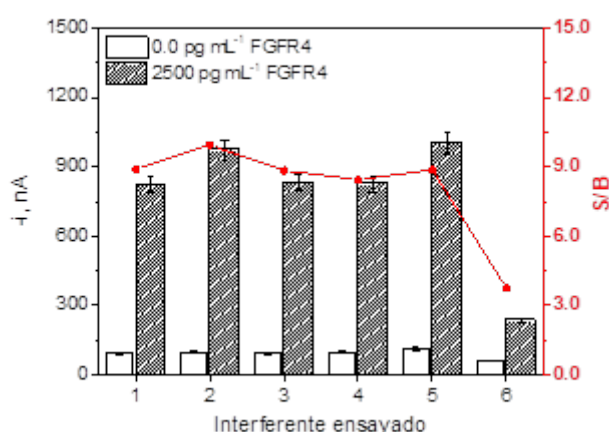


Figura 40: Estudio de selectividad del inmunosensor de FGFR4. Respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (barras blancas, B) y 2500 (barras rayadas, S) pg mL⁻¹ de FGFR4 preparados en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) sin suplementar (1) o suplementada con: 10.0 ng mL⁻¹ TNF (2); 200 ng mL⁻¹ p53 (3); 5.0 mg mL⁻¹ BSA (4); 5.0 mg mL⁻¹ hemoglobina (5), y 1.0 mg mL⁻¹ IgG humana (6). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.1.3.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE LISADOS CELULARES

La aplicabilidad real del inmunosensor desarrollado se demostró determinando el contenido endógeno de FGFR4 en lisados de células cancerígenas de mama (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3), colon (KM12C, KM12SM, SW480 y SW620) y páncreas (BxPC3) que expresan diferentes niveles del receptor diana.

Tras el procedimiento de lisis celular, detallado en el Apdo. 3.3.3.3 de esta Tesis Doctoral, se evaluó la posible existencia de efecto matriz en lisados celulares comparando la pendiente del calibrado de adiciones estándar obtenido con el inmunosensor desarrollado para concentraciones crecientes de estándares de FGFR4 hasta un nivel de 5000 pg mL^{-1} , preparados en disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) en presencia de $2.5 \text{ }\mu\text{g}$ de lisado de células KM12SM (como ejemplo representativo de la matriz de la muestra seleccionada). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las pendientes obtenidas para el calibrado de estándares de FGFR4 representado en la **Figura 39** ($(0.278 \pm 0.002) \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$) y el de adiciones estándar preparado en lisados de células KM12SM ($(0.270 \pm 0.04) \text{ nA pg}^{-1} \text{ mL}$), confirmó la ausencia de efecto matriz y, por tanto, la posibilidad de llevar a cabo la determinación del receptor en lisados celulares por simple interpolación de las corrientes amperométricas registradas para cada muestra en el calibrado construido para estándares de FGFR4.

Los contenidos que se resumen en la **Tabla 17**, proporcionados por el inmunosensor siguiendo el protocolo descrito, y mediante un kit espectrofotométrico ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos, demuestran la buena concordancia existente entre los resultados que proporcionan ambas metodologías. Por otro lado, en la **Figura 41**, se comparan los amperogramas obtenidos con los inmunosensores desarrollados (**Figura 41b**) y los resultados que proporciona la técnica Western Blot (**Figura 41a**), demostrándose nuevamente la concordancia entre los valores de expresión de FGFR4 obtenido en cada uno de los lisados celulares por ambos métodos.

Tabla 17: Determinación del contenido endógeno de FGFR4 en distintos lisados celulares con el inmunosensor amperométrico desarrollado y un kit espectrofotométrico ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos, empleando en ambos casos 2.5 µg de lisado para realizar la determinación.

<i>Lisados celulares ensayados</i>	<i>Inmunosensor amperométrico</i>		<i>Método ELISA espectrofotométrico</i>	
	<i>FGFR4, pg µg⁻¹</i>	<i>RSD (n=3), %</i>	<i>FGFR4, pg µg⁻¹</i>	<i>RSD (n=3), %</i>
<i>MCF-7</i>	<i>(11.0 ± 0.3)</i>	<i>1.1</i>	<i>(11 ± 1)</i>	<i>5.0</i>
<i>MDA-MB-436</i>	<i>(1.8 ± 0.4)</i>	<i>9.0</i>	<i>(1.8 ± 0.5)</i>	<i>10.0</i>
<i>SK-BR-3</i>	<i>(12.9 ± 0.9)</i>	<i>2.7</i>	<i>(13 ± 2)</i>	<i>7.3</i>
<i>BxPC3</i>	<i>(4.3 ± 0.2)</i>	<i>1.6</i>	<i>(4.1 ± 0.5)</i>	<i>4.2</i>
<i>SW620</i>	<i>(3.5 ± 0.4)</i>	<i>4.8</i>	<i>(3.2 ± 0.5)</i>	<i>6.8</i>
<i>SW480</i>	<i>(6 ± 1)</i>	<i>7.4</i>	<i>(6.0 ± 0.9)</i>	<i>5.8</i>
<i>KM12C</i>	<i>(5.7 ± 0.3)</i>	<i>1.8</i>	<i>(6 ± 1)</i>	<i>7.7</i>
<i>KM12SM</i>	<i>(7 ± 1)</i>	<i>6.0</i>	<i>(7 ± 2)</i>	<i>9.5</i>

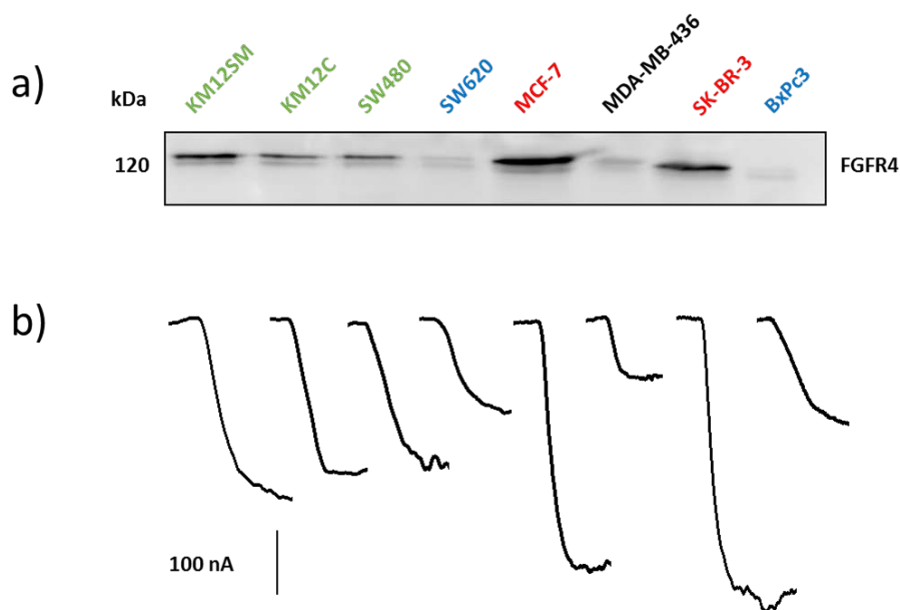


Figura 41: Análisis del receptor FGFR4 en lisados celulares mediante Western Blot empleando 10.0 µg de muestra (a) y registros amperométricos obtenidos con el inmunosensor desarrollado para 2.5 µg de cada lisado celular (b).

Los resultados obtenidos para la determinación de FGFR4 en lisados celulares empleando el inmunosensor desarrollado indicaron una clara hiperexpresión del receptor en

células de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3, y en células de cáncer de colon KM12SM. Estas observaciones coinciden con los resultados descritos por Tiong y col., que determinaron la hiperexpresión de FGFR4, a nivel proteico y genético, en distintas líneas celulares de cáncer de mama entre las que se encuentran los subtipos MCF-7 y SK-BR-3 [Tiong, 2016], y por Peláez-García y Barderas, que encontraron una mayor expresión del receptor en células de colon metastásicas KM12SM, en comparación con células con bajo potencial metastásico KM12C y SW480 [Peláez-García, 2013], [Barderas, 2012], y en células de adenocarcinoma pancreático primario BxPC3, empleadas como control [Peláez-García, 2013].

Para concluir este capítulo, es importante resaltar que se ha desarrollado el primer inmunosensor descrito hasta la fecha para la determinación de FGFR4 y que presenta unas características analíticas y operacionales adecuadas que han permitido su aplicación real y pionera para la determinación cuantitativa de este biomarcador en muestras de gran complejidad. El inmunosensor desarrollado emplea un protocolo mucho más sencillo, que involucra una sola etapa de incubación y un tiempo de ensayo de solo 15 minutos, significativamente inferior al que requieren las metodologías convencionales ELISA o Western-Blot. Además, la metodología puesta a punto, capaz de proporcionar resultados cuantitativos fiables empleando una cantidad de muestra 4 veces inferior a la requerida por la metodología Western Blot para proporcionar solo resultados semicuantitativos, ofrece unas características idóneas para su integración en dispositivos portátiles tipo POC que permitan el análisis descentralizado y rutinario de FGFR4 y de otros receptores relevantes pertenecientes a la misma familia, a niveles clínicamente relevantes.

4.1.1.4. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER-2)

En este apartado se discuten los resultados más relevantes incluidos en la publicación *Eletxigerra et al. Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells. Biosensors & Bioelectronics 70 (2015) 34–41*, en la que también colaboré durante la realización de esta Tesis Doctoral y cuyo documento se presenta como anexo al final de la misma.

La amplificación del gen *HER-2* y la consecuente hiperexpresión de su receptor se encuentran estrechamente asociadas con los subtipos moleculares de cáncer de mama de mayor agresividad, que tienden a crecer a mayor velocidad con la posibilidad de diseminarse y de recidivas, en comparación con los subtipos de cáncer de mama que no muestran una expresión descontrolada del receptor. De esta manera, la determinación cuantitativa de HER-2 permite establecer diagnósticos y pronósticos más fiables, establecer con mayor precisión los intervalos libres de enfermedad, y vaticinar la eficiencia frente a los tratamientos endocrinos disponibles, lo que posiciona a este receptor como uno de los biomarcadores de mayor utilidad diagnóstica, pronóstica y de predicción para la monitorización, clasificación y seguimiento clínico de este tipo de neoplasia.

En colaboración con el Instituto IK4-Tekniker de Eibar (España), y en particular, con el grupo liderado por el Dr. Santos Merino, se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico de gran sensibilidad basado en una configuración de ensayo tipo sándwich, para la determinación del receptor de membrana HER-2 en lisados celulares y, de forma pionera, directamente en células enteras, y de su fracción soluble en muestras de suero.

En la **Figura 42** se esquematiza el fundamento y las principales etapas que conlleva la fabricación de los inmunosensores tipo sándwich a partir de HOOC-MBs para la determinación amperométrica de HER-2.

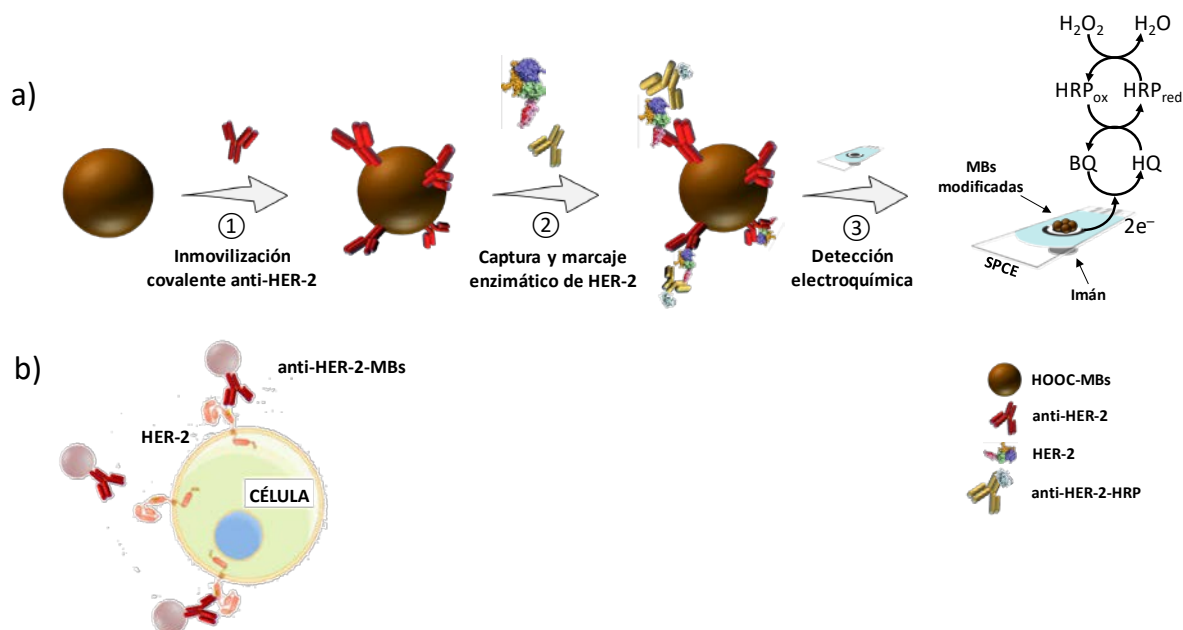


Figura 42: Protocolo de preparación del inmunosensor desarrollado para la determinación de HER-2 en suero, lisados celulares y células enteras (a). Tras la modificación de las HOOC-MBs con el anti-HER-2 (1) se lleva a cabo la captura y el marcaje enzimático del receptor HER-2 en una única etapa de incubación (2), y la captura magnética de las MBs modificadas para la transducción amperométrica final sobre un SPCE (3). Detalle de la captura del receptor de membrana HER-2 directamente en células enteras empleando anti-HER-2-MBs (b).

Como se muestra en la **Figura 42**, de manera similar a los protocolos empleados en la preparación de los inmunosensores desarrollados para la determinación de CD105 y FGFR4, tras la etapa de activación de los grupos carboxilo presentes en la superficie de las MBs, se llevó a cabo la inmovilización covalente del anticuerpo de captura (anti-HER-2) y una etapa posterior para asegurar el bloqueo de los grupos funcionales remanentes activados. Seguidamente, las anti-HER-2-MBs se incubaron, durante 60 minutos a 25 °C, con disoluciones mezcla que contenían la concentración apropiada de estándar de HER-2 (o la muestra a analizar) suplementada con la concentración correspondiente de anti-HER-2-HRP, produciéndose de manera simultánea la captura específica de HER-2 y su marcaje enzimático con anti-HER-2-HRP.

4.1.1.4.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Con el fin de desarrollar una metodología capaz de satisfacer las exigentes demandas, en términos de sensibilidad y selectividad, que requiere la determinación del receptor objetivo en las muestras seleccionadas, se optimizaron todas las variables experimentales que afectan al funcionamiento y prestaciones del inmunosensor desarrollado, empleando como criterio de selección la mayor discriminación entre las corrientes amperométricas obtenidas para estándares que contenían 0.0 (B) y 5.0 (S) ng mL⁻¹ de HER-2.

A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en los estudios de optimización de la concentración del anticuerpo de captura (anti-HER-2) y de detección (anti-HER-2-HRP).

- Optimización de las concentraciones de anti-HER-2 y anti-HER-2-HRP

Para estudiar su dependencia se varió la concentración de ambos anticuerpos en los rangos comprendidos entre 0.0–10.0 µg mL⁻¹ (anti-HER-2) y 0.0–2.0 µg mL⁻¹ (anti-HER-2-HRP), obteniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 43**.

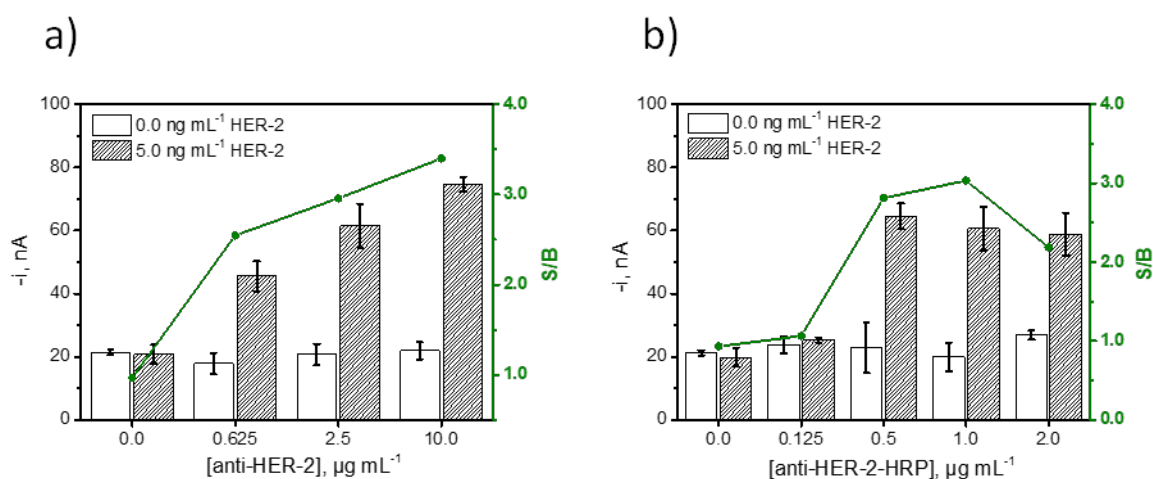


Figura 43: Respuestas amperométricas obtenidas con inmunosensores fabricados empleando diferentes concentraciones de anti-HER-2 (a) y anti-HER-2-HRP (b), para estándares de 0.0 (barras blancas, B) y 5.0 (barras rayadas, S) ng mL⁻¹ de HER-2. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Las bajísimas corrientes catódicas y la falta de discriminación (relación S/B~1) obtenidas sobre las HOOC-MBs en ausencia de anti-HER-2 inmovilizado (**Figura 43a**) garantizaron la viabilidad de la estrategia propuesta y la ausencia de adsorciones inespecíficas de HER-2 y anti-HER-2-HRP sobre las MBs. Como puede observarse, el valor de S/B aumentaba con la concentración de anti-HER-2 inmovilizado, debido a la poca variación que experimentaban las señales inespecíficas y al aumento significativo de las específicas en el intervalo de concentraciones evaluado.

Por otro lado, la dependencia de las respuestas amperométricas con la concentración de anti-HER-2-HRP (**Figura 43b**) produjo un aumento en la relación S/B hasta una concentración de anticuerpo correspondiente a $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor a partir del cual disminuía significativamente debido a la estabilización de las respuestas específicas y al aumento de las inespecíficas para concentraciones de anti-HER-2-HRP superiores a ésta.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron valores de 10.0 y $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ como concentraciones óptimas de anti-HER-2 y anti-HER-2-HRP, respectivamente, para estudios posteriores.

El resto de las variables experimentales optimizadas para el desarrollo del inmunosensor de HER-2, seleccionadas siguiendo el mismo criterio establecido anteriormente, entre las que se incluyen el número de etapas de incubación requeridas y su duración, se resumen en la **Tabla 18**.

Tabla 18: Variables experimentales optimizadas en el desarrollo del inmunosensor amperométrico tipo sándwich para la determinación de HER-2.

<i>Variable experimental</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>[anti-HER-2], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–10.0</i>	<i>10.0</i>
<i>[anti-HER-2-HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–2.0</i>	<i>1.0</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>1–2</i>	<i>1</i>
<i>$t_{\text{incubación HER-2 + anti-HER-2-HRP}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>60</i>

4.1.1.4.2. CURVA DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Tras seleccionar las condiciones experimentales que aseguraban el mejor funcionamiento del inmunosensor, se procedió a caracterizar su comportamiento analítico para la determinación amperométrica de estándares de HER-2 (preparados en PBST). La curva de calibrado construida (**Figura 44**) confirmaba la relación lineal ($r= 0.999$) entre las respuestas amperométricas obtenidas y la concentración del antígeno de interés en el rango de concentración comprendido entre 0.1 y 32.0 ng mL⁻¹, con unos valores para la pendiente y ordenada en el origen de (10.46 ± 0.07) nA ng⁻¹ mL y (23.30 ± 0.01) nA, respectivamente.

Los valores de los LD y LC (criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$), resultaron de 26 y 87 pg mL⁻¹, respectivamente. Asimismo, la buena reproducibilidad del proceso de preparación del inmunosensor, modificación de las MBs, y detección electroquímica, queda demostrada a partir del valor de la desviación estándar relativa obtenida con las respuestas proporcionadas por 5 inmunosensores diferentes preparados de la misma manera, para estándares de 5.0 ng mL⁻¹ de HER-2 (RSD = 5.6 %).

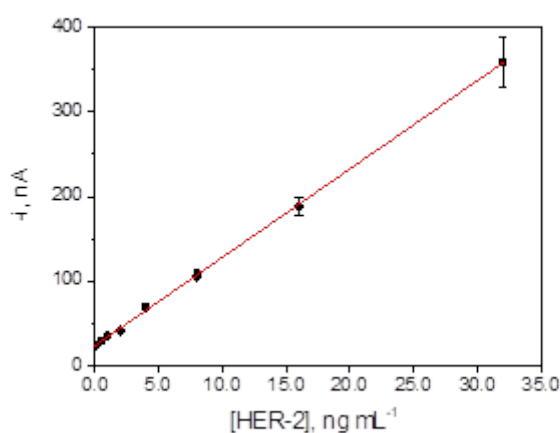


Figura 44: Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor desarrollado para estándares de HER-2 preparados en disolución reguladora de PBST. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Diversos estudios han demostrado que el 22–73 % de pacientes con cáncer de mama metastásico presentan niveles séricos del receptor HER-2 significativamente superiores al nivel de corte establecido (15 ng mL⁻¹) [Fornier, 2005], [Kong, 2006], [Fehm, 2004], [Sandri, 2004], y concordantes con el estatus tisular de HER-2 [Sasaki, 2015].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es importante destacar que, de acuerdo con las características analíticas obtenidas, el inmunosensor desarrollado permite detectar HER-2 a un nivel 557 veces inferior a su nivel de relevancia clínica, lo que demuestra la adecuación de esta metodología para la realización de este tipo de determinaciones, tremendamente demandadas por la oncología actual.

4.1.1.4.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Antes de evaluar su aplicabilidad práctica, se caracterizó la selectividad de la metodología comparando las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (B) y 5.0 (S) ng mL⁻¹ de HER-2 preparados en ausencia y en presencia de potenciales interferentes que coexisten con el antígeno de interés en las muestras seleccionadas.

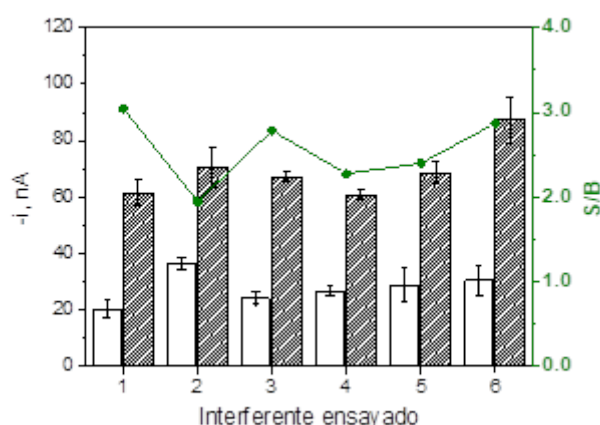


Figura 45: Estudio de selectividad del inmunosensor de HER-2. Respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 0.0 (barras blancas, B) y 5.0 (barras rayadas, S) ng mL⁻¹ de HER-2 preparados en disolución reguladora de PBST (1) y suplementados con 50.0 mg mL⁻¹ BSA (2); 5.7 µg mL⁻¹ HSA (3); 11.1 µg mL⁻¹ IgG humana (4); 10.0 ng mL⁻¹ TNF (5) y 3.0 mM EDTA (6). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

A pesar de que las concentraciones ensayadas para cada interferente, entre los que se incluyen BSA, HSA, IgG humana, TNF y EDTA, fueron considerablemente superiores a la del receptor diana, tal y como muestran los resultados presentados en la **Figura 45**, ninguna de las especies evaluadas interfirió de manera significativa en la determinación de HER-2. Estos resultados ponían de manifiesto tanto la elevada selectividad de los anticuerpos empleados en la fabricación del inmunosensor como la fiabilidad de la metodología.

4.1.1.4.4. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN EN SUERO, LISADOS CELULARES Y CÉLULA ENTERA

Aprovechando las excelentes características analíticas que ofrecen los inmunosensores desarrollados, se demostró su aplicabilidad y utilidad clínica real determinando HER-2 en muestras de suero y células de cáncer de mama, tanto lisadas como enteras.

Tras comparar los valores de las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas con los inmunosensores para estándares de HER-2 preparados en disolución reguladora de PBST ((10.46 ± 0.07) nA ng⁻¹ mL), en muestras de suero diluidas al 40 % en disolución reguladora de PBS suplementada con 1 M de NaCl, 2 % (v/v) de Tween® 20 y 0.5 % (p/v) de BSA ((10.98 ± 1.26) nA ng⁻¹ mL), y a modo de ejemplo, en presencia de 2.5 µg de lisados de células SK-BR-3 ((10.37 ± 1.56) nA ng⁻¹ mL), se concluyó que no existía efecto matriz en ninguna de las matrices a analizar, por lo que la determinación del contenido endógeno de HER-2 se llevó a cabo interpolando las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra en la curva de calibrado obtenida para estándares de HER-2 (**Figura 44**).

Es importante mencionar que, en base a resultados previos descritos en la literatura [Eletxigerra, 2014], las muestras de suero ensayadas se diluyeron al 40 % en disolución reguladora de PBS suplementada con 1 M de NaCl, 2 % (v/v) de Tween® 20 y 0.5 % (p/v) de BSA con la finalidad de disminuir el efecto matriz y simplificar el análisis en esta muestra biológica.

Los resultados obtenidos para la determinación del contenido endógeno de HER-2 en muestras de suero (una comercial y dos de individuos sanos) y en lisados de células de cáncer de mama que expresan diferentes niveles de este receptor (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3), así como su validación mediante un kit espectrofotométrico comercial ELISA (basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos), y los registros amperométricos obtenidos con los inmunosensores desarrollados en presencia de 2.5 µg de los lisados celulares indicados, se muestran en la **Tabla 19** y en la **Figura 46**.

Adicionalmente los lisados celulares fueron analizados cualitativamente mediante SDS-PAGE y tinción en Azul de Coomasie.

Tabla 19: Determinación del contenido endógeno de HER-2 en muestras de suero y lisados celulares empleando el inmunosensor amperométrico desarrollado y un kit espectrofotométrico ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Tipo de muestra		Inmunosensor amperométrico		Método ELISA espectrofotométrico	
		HER-2	RSD $n=3$, %	HER-2	RSD $n=3$, %
Suero (ng mL ⁻¹)	Comercial	(26 ± 2)	3.3	(24.5 ± 0.8)	1.3
	Individuo sano 1	(15 ± 1)	2.9	(14.6 ± 0.3)	0.7
	Individuo sano 2	(16 ± 2)	5.7	(15.5 ± 0.6)	1.6
Lisados celulares (pg µg ⁻¹)	MCF-7	(67 ± 14)	8.7	(69 ± 5)	3.1
	MDA-MB-436	(64 ± 6)	5.5	(65 ± 12)	7.3
	SK-BR-3	(205 ± 23)	4.5	(198 ± 12)	2.5

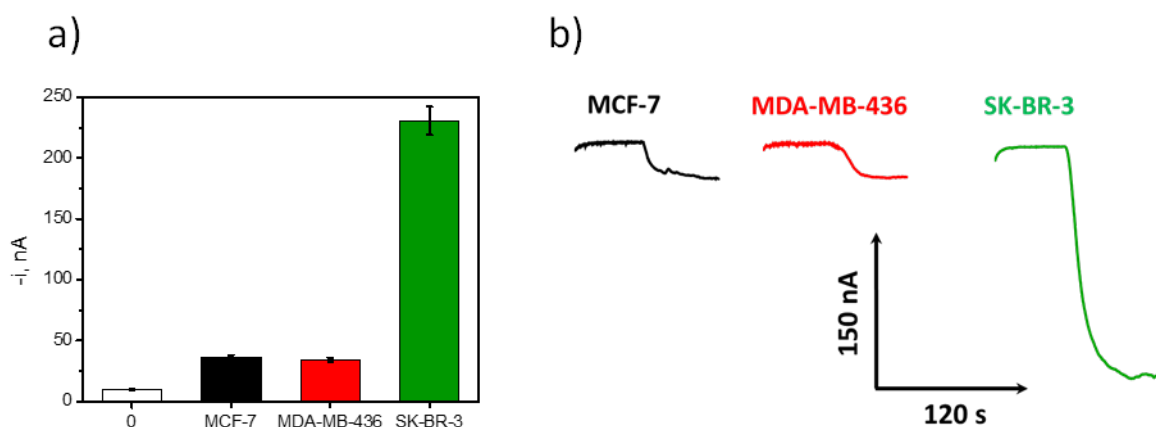


Figura 46: Determinación del contenido endógeno de HER-2 en lisados de células de cáncer de mama empleando el inmunosensor desarrollado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 2.5 µg de lisados de células MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3 (a). Amperogramas reales obtenidos con los inmunosensores para los lisados de las células indicadas (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Las concentraciones de HER-2 determinadas con el inmunosensor desarrollado en las muestras de suero de individuos sanos estaban de acuerdo con el nivel de corte establecido para el receptor de interés en esta matriz biológica (15.0 ng mL⁻¹) lo que confirma la elevada fiabilidad de las inmunoplateformas desarrolladas para la determinación en este tipo de muestras.

En cuanto al análisis de los lisados celulares, las respuestas proporcionadas por los inmunosensores indicaron una clara hiperexpresión del receptor diana en las células SK-BR-3 (HER-2⁺), en comparación con los niveles encontrados en las células MCF-7 y MDA-MB-436 (HER-2⁻). Estos resultados, que concuerdan con el estado del receptor HER-2 en estas células (indicado entre paréntesis) y con los obtenidos mediante la metodología ELISA y SDS-PAGE, confirman nuevamente la aplicabilidad práctica de los inmunosensores desarrollados para la determinación fiable de HER-2 también en este tipo de muestras.

Además, con el fin de demostrar más exhaustivamente la fiabilidad de la metodología, se llevó a cabo la determinación de HER-2 también en disoluciones que contenían mezcla de los distintos lisados celulares evaluados.

La comparación de las intensidades de corriente obtenidas para disoluciones conteniendo 1.25 μg de cada uno de los lisados individuales (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3), y disoluciones mezcla que contenían dos (MCF-7 y SK-BR-3 o MDA-MB-436 y SK-BR-3) y tres (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3) lisados (**Figura 47**), demostraron nuevamente la obtención de las mayores respuestas amperométricas en presencia de las células HER-2⁺ (SK-BR-3) y sin ninguna interferencia por parte de las células HER-2⁻ (MCF-7 y MDA-MB-436).

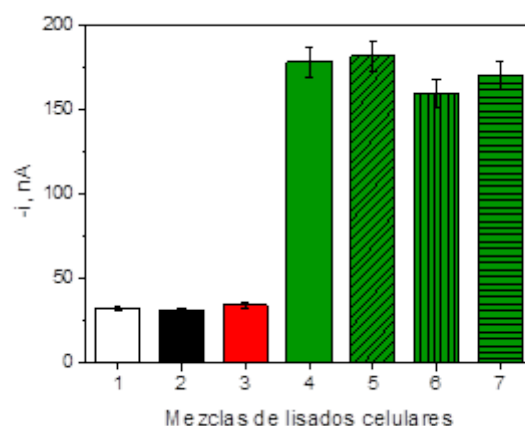


Figura 47: Determinación de HER-2 en mezclas de lisados celulares empleando el inmunosensor desarrollado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (1) y en presencia de 1.25 μg de lisados de células MCF-7 (2), MDA-MB-436 (3) y SK-BR-3 (4), y disoluciones mezcla que contenían 1.25 μg de lisados de SK-BR-3 y MCF-7 (5), SK-BR-3 y MDA-MB-436 (6) y SK-BR-3, MCF-7 y MDA-MB-436 (7). $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Finalmente, aunque la determinación de los niveles séricos de HER-2 resulta especialmente relevante para una clasificación certera de pacientes con cáncer, es indudable que la detección de este biomarcador en células de mama es de gran interés clínico. Por ello, y de forma pionera empleando un inmunosensor electroquímico, se evaluó la utilidad del inmunosensor desarrollado para la determinación de este receptor de membrana en células intactas de mama.

Con objeto de demostrar la posibilidad de reconocer el receptor HER-2 directamente en célula entera, las anti-HER-2-MBs se incubaron durante 60 minutos con una suspensión de 1×10^6 células mL^{-1} de cada tipo celular analizado, y se observaron los bioconjugados magnéticos resultantes en un microscopio. Las fotomicrográficas obtenidas, que se muestran en la **Figura 48**, confirman claramente la captura de un mayor número de células SK-BR-3 por parte de las anti-HER-2-MBs debido a la mayor expresión del receptor de membrana presente en este tipo celular.

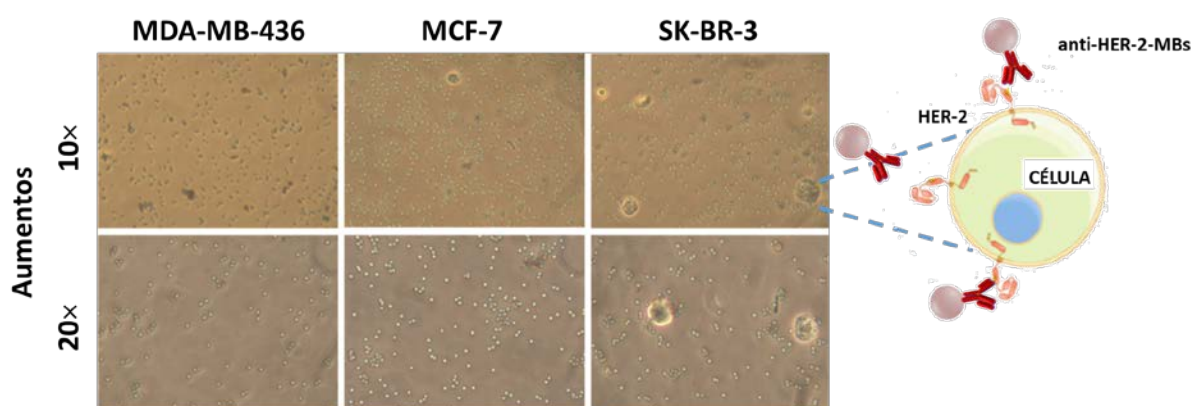


Figura 48: Fotomicrográficas obtenidas tras la incubación de anti-HER-2-MBs con suspensiones de células MDA-MB-436, MCF-7 y SK-BR-3.

El marcaje de estos bioconjugados con anti-HER-2-HRP empleando el mismo protocolo optimizado para la determinación de estándares, permitió estimar de manera fiable la cantidad de proteína y, de manera aproximada, el número de receptores HER-2 presente en la superficie de los tres tipos celulares ensayados, nuevamente, por simple interpolación de las señales amperométricas obtenidas en el calibrado externo construido para estándares de HER-2 (**Figura 44**). Los resultados obtenidos, recogidos en la **Tabla 20**, concuerdan satisfactoriamente con los estimados por otros autores empleando otras metodologías, de

$(5-6) \times 10^5$ y $(1-2) \times 10^4$ receptores célula⁻¹ para los tipos celulares SK-BR-3 y MCF-7, respectivamente [Zhang, 2011], [Shi, 2009], y confirman el excelente comportamiento del inmunosensor desarrollado para la determinación de un receptor de membrana en células intactas. Es importante destacar que esta aplicación no es posible con las metodologías ELISA convencionales, que requieren etapas previas de fijación y permeabilización para realizar la determinación, y que ha sido demostrada en este trabajo, de forma pionera, empleando un biosensor electroquímico.

Tabla 20: Estimación de la cantidad y del número de receptores HER-2 por célula de cáncer de mama empleando el inmunosensor desarrollado para la determinación amperométrica *in vitro* del receptor HER-2 directamente en la superficie de células enteras.

Célula	[HER-2], fg célula ⁻¹	Receptores HER-2 célula ⁻¹ *
MCF-7	(6.9 ± 0.8)	(22 ± 2)
MDA-MB-436	(1.4 ± 0.2)	(4.7 ± 0.5)
SK-BR-3	(162 ± 18)	(530 ± 60)

* Valores estimados mediante interpolación de la señal amperométrica obtenida en la curva de calibrado construida para estándares de HER-2 (Figura 44). La estimación del número de receptores HER-2 por célula se realizó teniendo en cuenta el número de células empleadas en el ensayo, el peso molecular de HER-2 (185 kDa), y el número de Avogadro.

Los resultados discutidos demuestran que el inmunosensor desarrollado permite, empleando protocolos muy sencillos y tiempos reducidos de ensayo, la determinación precisa del contenido endógeno de HER-2 en muestras de suero, con gran sensibilidad y un LD significativamente inferior al valor de corte establecido para este receptor, y la discriminación fiable entre células que expresan distintos niveles de HER-2 tanto en lisados crudos como directamente en células enteras sin necesidad de llevar a cabo procesos previos de fijación y permeabilización celular.

4.1.1.5. INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS A LA PROTEÍNA p53

Los resultados de este apartado dieron lugar al artículo *Garranzo-Asensio et al. Toward liquid biopsy: determination of the humoral immune response in cancer patients using HaloTag fusion protein-modified electrochemical bioplatfoms. Analytical Chemistry 88 (2016) 12339–12345*, que se adjunta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

En la actualidad uno de los tipos de biomarcadores proteicos más prometedores en el diagnóstico temprano/pronóstico de cáncer y otras enfermedades son los autoanticuerpos producidos frente a antígenos específicos, cuya hiperexpresión se ha descrito meses o incluso años antes de que la enfermedad manifieste síntomas clínicos, razón por la que se les considera biomarcadores de gran potencial para diagnóstico temprano. Otras ventajas adicionales que ofrece la determinación de autoanticuerpos en comparación con la de sus respectivos antígenos, incluyen su mayor cantidad (debido a la amplificación por el sistema inmune) y una mayor estabilidad (tanto en circulación como fuera del cuerpo), ya que no están sujetos a proteólisis y presentan una larga vida en sangre (entre 7 y 30 días), lo que simplifica el manejo de la muestra.

En colaboración con el Dr. Rodrigo Barderas, del Instituto de Salud Carlos III, se ha desarrollado una estrategia electroquímica que combina, por primera vez, el empleo de MBs y proteínas de fusión HaloTag para la determinación de autoanticuerpos específicos al supresor tumoral p53 (p53-AAs), de manera efectiva y con gran selectividad. La aplicación real de esta novedosa y atractiva estrategia se ha demostrado mediante el análisis de muestras de suero tanto de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon, como de pacientes diagnosticados con cáncer de ovario y colorrectal.

Es importante destacar que, además del coste, a veces inasequible, de ciertas proteínas recombinantes, los procesos de etiquetado o marcaje de proteínas muestran ciertas limitaciones asociadas al bajo rendimiento obtenido empleando técnicas recombinantes convencionales. Además, los ensayos basados en estas proteínas presentan, a menudo, un elevado número de falsos positivos atribuidos a interferencias por parte del huésped bacteriano utilizado para su producción. La tecnología HaloTag resuelve la mayoría de estas limitaciones a partir de un planteamiento basado en dos etapas principales que

incluyen: la modificación genética de la proteína de interés mediante la fusión del C_t a un tag Halo de 33 kDa, y el empleo de un ligando HaloTag con aplicaciones específicas.

Esta metodología de etiquetado biológico, que presenta numerosas aplicaciones biomédicas, consiste fundamentalmente en la unión covalente entre la proteína de interés fusionada a HaloTag y el ligando HaloTag, que generalmente es una molécula de naturaleza orgánica formada por un grupo reactivo constante (cloroalcano) y un grupo funcional variable, incluyendo biotina, entidades fluorescentes y resinas, entre muchos otros, de una manera rápida e irreversible. El mecanismo molecular de esta tecnología se basa en el empleo de una enzima bacteriana haloalcano deshidrogenasa (*Rhodococcus rhodochrous*) mutada que cataliza la reacción de formación de un estado intermedio de transición covalente entre la proteína fusionada a HaloTag y el cloroalcano del ligando HaloTag, produciendo finalmente un aducto de gran estabilidad (proteína fusionada a HaloTag) [England, 2015], [Urh, 2012], tal y como se esquematiza en la **Figura 49**.

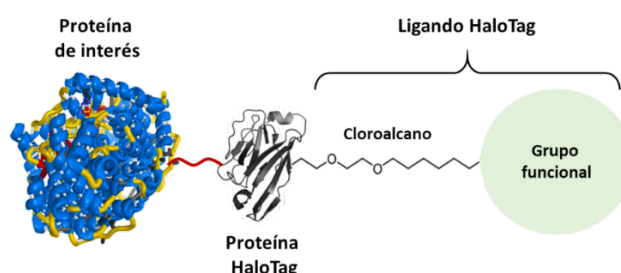


Figura 49: Representación esquemática de la tecnología HaloTag que permite la fusión de la proteína HaloTag (modificada covalentemente con el grupo funcional seleccionado) a cualquier proteína de interés.

Entre la variedad de grupos funcionales del ligando HaloTag disponibles, se encuentran un tipo de resinas con propiedades magnéticas sobre las que es posible inmovilizar de manera efectiva las proteínas de interés fusionadas al tag Halo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el fundamento de la plataforma biosensora propuesta, representado de una manera general en la **Figura 50**, consiste en el empleo de MBs comerciales modificadas con HaloTag (HaloTag-MBs) sobre cuya superficie se lleva a cabo, en una única etapa, tanto la expresión *in vitro*, empleando reticulocito de ratón, como la inmovilización de la proteína p53 fusionada al tag Halo. Las p53-HaloTag-MBs se bloquearon con disolución de caseína y PBS (1:1) con la finalidad de evitar adsorciones inespecíficas de otras entidades proteicas presentes en la muestra. A partir de este punto, la

estrategia biosensora incluía dos etapas de incubación: una de 60 minutos en la que las p53-HaloTag-MBs se incubaron con la muestra de suero a analizar diluida 200 veces en disolución reguladora de PBS suplementada con 0.1 % (v/v) de Tween® 20 y leche desnatada en polvo al 3 % (p/v), produciéndose la captura eficiente de los autoanticuerpos frente a p53 presentes, y otra de 30 minutos en la que se llevó a cabo el marcaje enzimático de los autoanticuerpos capturados con disoluciones de anti-IgG-HRP (dilución 1:600), preparado en disolución reguladora de PBST suplementada con leche desnatada al 3 % (p/v). Los bioconjugados magnéticos resultantes se capturan magnéticamente sobre la superficie del SPCE y se realiza la transducción amperométrica en presencia del sistema H_2O_2/HQ .

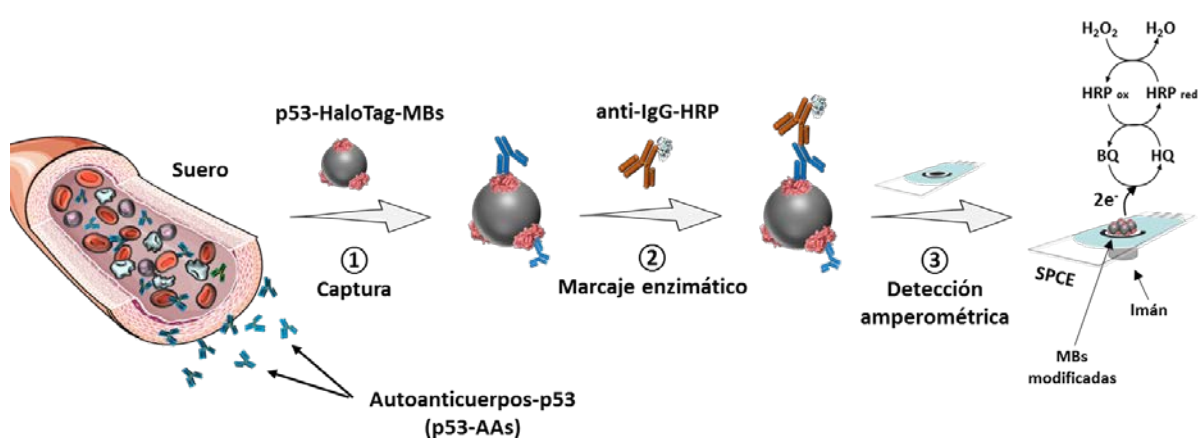


Figura 50: Etapas involucradas en la preparación del inmunosensor amperométrico desarrollado para la determinación de autoanticuerpos específicos a la proteína p53 (p53-AAs) en muestras de suero empleando la tecnología HaloTag. La proteína HaloTag-p53 se expresa *in vitro* y se inmoviliza en la superficie de las MBs, y los bioconjugados resultantes (p53-HaloTag-MBs) se emplean para la captura específica de los autoanticuerpos frente a p53 (p53-AAs) presentes en la muestra analizada (1). Tras el marcaje enzimático de los autoanticuerpos capturados sobre las MBs con anti-IgGs humanas conjugadas con HRP (2), se capturan sobre la superficie del SPCE y se realiza la transducción amperométrica empleando el sistema H_2O_2/HQ (3).

Nuevamente, y con objeto de conseguir las mejores prestaciones analíticas, se optimizaron las variables más determinantes involucradas en la fabricación y funcionamiento del inmunosensor tomando como criterio de selección, en este caso, la relación entre las respuestas amperométricas obtenidas para pules de sueros con seroreactividad positiva (p53+) y negativa (p53-) frente al antígeno tumoral p53 (relación p53+/p53-). En la **Tabla 21** se resumen los rangos evaluados y los valores seleccionados de las variables optimizadas.

Tabla 21: Variables experimentales optimizadas, rangos evaluados y valores seleccionados para el desarrollo de inmunosensores amperométricos para la determinación de los niveles séricos de p53-AAs.

<i>Variable experimental</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>Dilución de la muestra de suero</i>	<i>1:1200–1:50</i>	<i>1:200</i>
<i>Tipo de anticuerpo de detección</i>	<i>anti-IgG-HRP; biotin-anti-IgG</i>	<i>anti-IgG-HRP</i>
<i>Dilución anti-IgG-HRP</i>	<i>1:1200–1:600</i>	<i>1:600</i>
<i>Volumen producto transcripción/traducción in vitro (p53), μL</i>	--	<i>1.8</i>
<i>HaloTag-MBs, μL</i>	--	<i>1.0</i>
<i>$t_{\text{incubación p53-HaloTag-MBs}}$, min</i>	--	<i>120</i>
<i>$t_{\text{etapa de bloqueo con solución bloqueante de caseína:PBS (1:1)}}$, min</i>	--	<i>120</i>
<i>$t_{\text{incubación suero}}$, min</i>	--	<i>60</i>
<i>$t_{\text{incubación anti-IgG-HRP}}$, min</i>	--	<i>30</i>

4.1.1.5.1. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

En las condiciones optimizadas se caracterizó el comportamiento del biosensor desarrollado usando como estándar el calibrador que se incluye en el kit ELISA comercial (suero humano diluido con una concentración definida de autoanticuerpos p53, de 10 U mL^{-1} , siendo 1 U la actividad de enlace a p53 que corresponde a $100 \mu\text{L}$ del calibrador sin diluir).

La curva de calibrado obtenida con los inmunosensores desarrollados para concentraciones crecientes del calibrador empleado como estándar (**Figura 51**) demostró un rango lineal para la determinación de autoanticuerpos frente a p53 comprendido entre 1.1 y 5.0 U mL^{-1} ($r = 0.999$), y valores de LD y de LC (criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$) de 0.34 y 1.1 U mL^{-1} , respectivamente, siendo s_b la desviación estándar de 10 medidas amperométricas obtenidas en presencia del control negativo (suero sin autoanticuerpos frente a p53) suministrado en el kit ELISA comercial diluido 100 veces, y m el valor de la pendiente de la curva de calibrado obtenida con el calibrador ($(215.2 \pm 0.2) \text{ nA U}^{-1} \text{ mL}$) mostrada en la **Figura 51**.

En el caso particular de este biosensor, resulta especialmente relevante evaluar la reproducibilidad del procedimiento experimental que implica su desarrollo, con objeto de

demostrar la robustez de los procesos de expresión *in vitro* e inmovilización de la proteína HaloTag-p53 sobre la superficie de HaloTag-MBs.

El valor de RSD obtenido a partir de las respuestas amperométricas obtenidas con 5 biosensores diferentes preparados de la misma manera, en presencia de una concentración de calibrador que se correspondía con una concentración de autoanticuerpos frente a p53 de 1.25 U mL^{-1} (RSD = 6.2 %), confirmó la robustez de todas las etapas que conlleva la fabricación y determinación con los inmunosensores desarrollados.

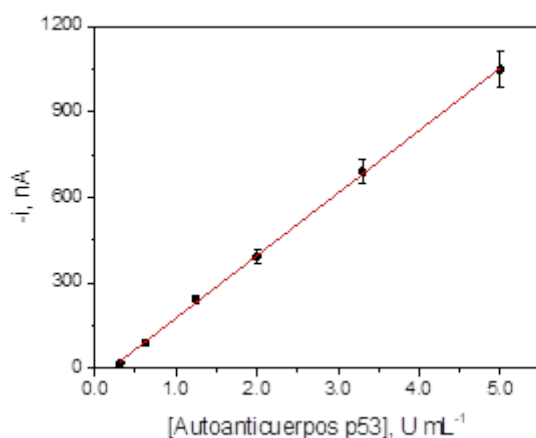


Figura 51: Curva de calibrado obtenida con el inmunosensor desarrollado empleando como estándar el calibrador incluido en el kit ELISA comercial (suero humano diluido con una concentración definida de autoanticuerpos p53, de 10 U mL^{-1}). $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Es importante destacar que la sensibilidad proporcionada por el inmunosensor ($215.2 \text{ nA U}^{-1} \text{ mL}$) era 440 veces superior a la de la metodología ELISA ($0.4876 \text{ u.a. U}^{-1} \text{ mL}$), y que el LD alcanzado por ambos métodos era muy similar (0.34 U mL^{-1} (inmunosensor) vs. $\sim 0.3 \text{ U mL}^{-1}$ (método ELISA)). Además, la evaluación de la estabilidad de las p53-HaloTag-MBs demostró que podían ser preparadas con antelación y almacenadas a 4°C en disolución reguladora de PBS filtrada durante 7 días (no se ensayaron tiempos superiores), lo que disminuye el tiempo total de ensayo a tan solo 1.5 horas. Estos resultados, junto con las ventajas adicionales que ofrece la transducción electroquímica en términos de coste y miniaturización, ampliamente comentadas a lo largo de esta Tesis Doctoral, demuestran la relevancia de la plataforma propuesta para el futuro desarrollo de dispositivos de coste competitivo y manejo sencillo.

para la determinación sensible y selectiva de autoanticuerpos séricos en el punto de atención (POC).

4.1.1.5.2. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA

La selectividad de la metodología se evaluó comparando las respuestas obtenidas mediante amperometría y luminiscencia, tras la incubación de MBs modificadas con distintas proteínas de fusión a HaloTag expresadas sobre su superficie, incluyendo p53, p63 y p73, con anticuerpos anti-HaloTag, anti-p53 y anti-p73, que son reconocidos por anticuerpos secundarios conjugados a HRP en una segunda etapa de incubación. Además, como control positivo se empleó la proteína HaloTag-GST, y como control negativo el vector pANT_cHalo DNA (preparado en ausencia de proteína expresada).

Los resultados proporcionados por el inmunosensor amperométrico desarrollado, mostrados en la **Figura 52** y concordantes con los obtenidos mediante luminiscencia, indicaron la obtención de respuestas positivas solo en presencia de los anticuerpos anti-HaloTag específicos para cada una de las proteínas de fusión HaloTag evaluadas. Estos resultados demuestran la versatilidad de la metodología y la posibilidad de trasladarla fácilmente a la determinación de autoanticuerpos específicos para otras proteínas sin requerir optimizaciones particulares de parámetros, por lo que podría servir como base para el desarrollo de una plataforma que permitiera el cribado de la respuesta inmune humoral en pacientes con cáncer mediante la multideterminación electroquímica de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos tumorales característicos de la neoplasia en estudio.

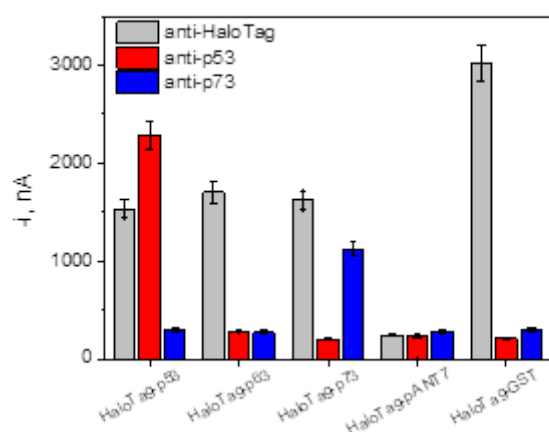


Figura 52: Evaluación de la selectividad de la metodología desarrollada empleando diferentes anticuerpos y proteínas de fusión a HaloTag. Respuestas amperométricas obtenidas tras la modificación covalente de HaloTag-MBs con diferentes proteínas de fusión (HaloTag-p53, HaloTag-p63 y HaloTag-p73) y su incubación con anticuerpos específicos (anti-HaloTag, anti-p53 y anti-p73) posteriormente reconocidos por anticuerpos secundarios conjugados a HRP. Se muestran también las respuestas obtenidas para las MBs modificadas con HaloTag-pANT7 (control negativo) y con HaloTag-GST (control positivo). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.1.1.5.3. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO HUMANO

Se demostró la aplicabilidad práctica de esta plataforma inmunosensora mediante el análisis de 24 muestras de suero de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon. De dichas muestras, seleccionadas de un total de 62 e identificadas mediante el método convencional ELISA, 12 correspondían a pacientes con seroreactividad positiva, y otras 12 a pacientes con seroreactividad negativa frente a p53. También se evaluó la utilidad de la metodología para la determinación en muestras de pacientes ya diagnosticados con cáncer (6 con cáncer de colon y 2 con cáncer de ovario).

Los resultados obtenidos (**Figura 53**) confirmaron que la plataforma biosensora proporcionó respuestas amperométricas de mayor intensidad para las muestras de suero identificadas por la metodología ELISA convencional como seropositivas (**Figura 53a**) que para las seronegativas (**Figura 53b**), lo que demuestra la fiabilidad de la metodología para la discriminación entre ambos tipos de pacientes.

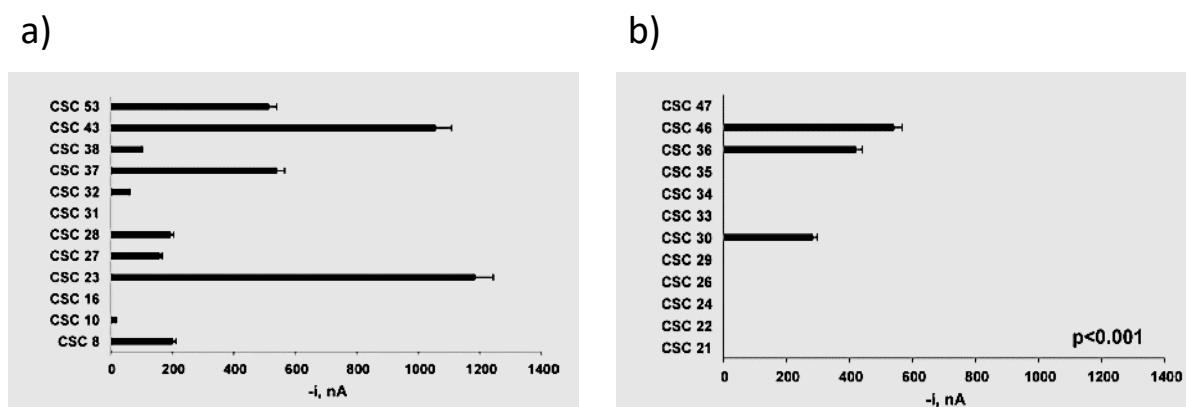


Figura 53: Respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor desarrollado para el análisis de muestras de suero de individuos con alto riesgo de padecer cáncer de colon, previamente clasificadas mediante el método ELISA como positivas (a) y negativas (b) frente a autoanticuerpos p53. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error representadas como el valor p del error estándar promedio calculado a partir de los resultados para muestras positivas y negativas.

Los valores medios de las señales obtenidas con cada metodología para muestras positivas y negativas a autoanticuerpos frente a p53 (**Tabla 22**), confirman que la plataforma biosensora permite una mejor discriminación que el kit comercial entre ambos tipos de muestras.

Tabla 22: Valores medios de las señales obtenidas con ambas metodologías para muestras de suero con diferente seroreactividad a p53.

<i>Muestra de suero</i>	<i>Inmunosensor amperométrico, nA</i>	<i>Método ELISA espectrofotométrico, u.a</i>
<i>Seroreactividad positiva a p53</i>	<i>(404.6 ± 101.4)</i>	<i>(0.34 ± 0.045)</i>
<i>Seroreactividad negativa a p53</i>	<i>(0 ± 0)</i>	<i>(0.11 ± 0.026)</i>
<i>Discriminación*</i>	<i>405</i>	<i>3.1</i>

* Estimada a partir de los valores medios.

Las discrepancias observadas entre ambos métodos pueden atribuirse a variaciones en cuanto a la estrategia de inmovilización empleada en cada caso, así como al procedimiento de expresión de la proteína p53 empleada en cada una de las estrategias (recombinante en la metodología ELISA y fusionada a HaloTag en el inmunosensor), con una influencia

determinante tanto en la eficiencia del reconocimiento de los autoanticuerpos de la muestra como en la presencia de falsos positivos.

Tras comprobarse la ausencia de efecto matriz en las muestras de suero previamente diluidas 200 veces, la cuantificación de autoanticuerpos con la plataforma electroquímica desarrollada en todas las muestras de suero analizadas se llevó a cabo por interpolación de las señales amperométricas obtenidas para cada muestra, en la curva de calibrado construida empleando como estándar el calibrador del kit ELISA, mostrada en la **Figura 51**.

La concentración media de autoanticuerpos encontrada en las 12 muestras de suero seropositivas resultó de $(445.08 \pm 105.34) \text{ U mL}^{-1}$, muy superior al nivel determinado para las muestras seronegativas $((27.21 \pm 1.22) \text{ U mL}^{-1})$, resultados que están de acuerdo con el valor de corte establecido por el kit espectrofotométrico comercial ELISA empleado (120 U mL^{-1}) para discriminar entre muestras de suero con seroreactividad positiva y negativa a p53.

Los resultados obtenidos con las inmunoplateformas en el análisis de muestras de pacientes ya diagnosticados con cáncer se resumen en la **Tabla 23**. Estos resultados confirmaron la fiabilidad de la metodología desarrollada para el análisis en diferentes cohortes de pacientes.

Tabla 23: Determinación de autoanticuerpos frente a p53 en muestras de suero de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y de ovario empleando el inmunosensor desarrollado.

<i>Muestra de suero</i>	<i>Tipo de neoplasia</i>	<i>[Autoanticuerpos p53], U mL⁻¹</i>
<i>LP7</i>	<i>Colon</i>	<i>457.7</i>
<i>LP18</i>		<i>257.4</i>
<i>LP31</i>		<i>601.2</i>
<i>LP40</i>		<i>1570.3</i>
<i>OV1</i>	<i>Ovario</i>	<i>289.0</i>
<i>OV3</i>		<i>265.7</i>

Los resultados de este capítulo demuestran que se ha desarrollado una plataforma inmunosensora que permite la determinación de autoanticuerpos séricos frente a antígenos asociados a tumores, que resulta competitiva en términos de sensibilidad y selectividad frente

a la estrategia ELISA convencional, que ha demostrado aplicabilidad para la determinación en suero de diferentes cohortes de pacientes y que, al ser fácilmente trasladable a la determinación de autoanticuerpos específicos frente a cualquier antígeno proteico sin necesidad de optimizaciones particulares, podría implementarse de manera sencilla en plataformas para cribado de la respuesta inmune humoral a través de la multideterminación de autoanticuerpos frente a antígenos específicos de la enfermedad en estudio.

4.1.2. DESARROLLO DE PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS DE RELEVANCIA EMERGENTE

En esta sección se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de diversas bioplataformas basadas en el empleo de novedosos receptores de afinidad caracterizados por su gran versatilidad, y en estrategias de amplificación fácilmente implementables en dispositivos POC, para biosensado fiable de miRNAs, biomarcadores genéticos de gran relevancia actual directamente implicados en angiogénesis, oncogénesis, enfermedades cardiovasculares y diferentes condiciones patológicas.

Las metodologías desarrolladas para la determinación de estos biomarcadores epigenéticos se basan en el empleo de MBs comerciales, bio-receptores novedosos selectivos a homo- y hetero- híbridos de RNA (proteínas virales y anticuerpos) y sondas sintéticas específicas de RNA y DNA lineales y de tipo horquilla. Como se discutirá en las siguientes secciones, todas las estrategias desarrolladas han demostrado características analíticas muy atractivas y aplicabilidad para la determinación fiable del contenido endógeno de miRNAs en muestras de RNA_t extraído de líneas celulares y tejidos humanos tumorales, tanto frescos como parafinados, sin necesidad de amplificar o preconcentrar previamente el material genético.

4.1.2.1. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO PROTEÍNAS VIRALES

4.1.2.1.1. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO UNA PROTEÍNA VIRAL COMO BIO-RECEPTOR DE CAPTURA

Se describen en este apartado los resultados más relevantes de la primera metodología desarrollada en el marco de esta Tesis Doctoral para la determinación de miRNAs y que dieron lugar al artículo *Campuzano et al. Magnetobiosensors based on viral protein p19 for miRNA determination in cancer cells and tissues. Angewandte Chemie International Edition 53 (2014) 6168 –6171*, documento que se presenta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

La metodología desarrollada se basa en el empleo de MBs funcionalizadas con quitina (Quitina-MBs), la proteína viral p19 como elemento de reconocimiento de captura, una secuencia sintética de RNA biotinilada en el extremo 3' (biotin-anti-miRNA) complementaria al miRNA diana (miRNA-21), un conjugado enzimático comercial de Estrep-HRP como marcador enzimático, y SPCE para realizar la transducción amperométrica.

La quitina, o poli (β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamida), es un polisacárido natural biodegradable y de baja toxicidad con elevada afinidad hacia proteínas recombinantes fusionadas a dominios de unión a quitina (CBD) [Dutta, 2004], [Bernard, 2004]. Así, las propiedades magnéticas de las Quitina-MBs y su modificación covalente con quitina permiten su aplicación como soportes para la captura/aislamiento rápido y eficaz de proteínas fusionadas a CBD, como la p19 comercial que se emplea en este trabajo, clonada y expresada en *Escherichia coli* y fusionada a la proteína de unión a maltosa en el extremo N_t (MBP) y a un CBD en el extremo C_t (MBP-p19-CBD), y capaz de “secuestrar” con gran afinidad homohíbridos de RNA (ds-RNA) de un tamaño comprendido entre 19–22 bp independientemente de su secuencia.

El fundamento de la metodología, desarrollada en colaboración con el Departamento de Medicina Celular y Molecular (CSIC, Madrid) y el Departamento de Patología del Hospital Universitario de Getafe (Madrid), y cuyo esquema se muestra en la **Figura 54**, consistió en la hibridación homogénea en disolución entre el miRNA diana contenido en la muestra de RNA_t y su sonda sintética de detección de RNA complementaria y biotinilada en un extremo (biotin-

anti-miRNA-21), bajo condiciones suaves de temperatura y agitación (25 °C/250 rpm), captura selectiva y eficiente de los homohíbridos de RNA biotinilados (biotin-ds-RNA) formados en disolución mediante partículas magnéticas de quitina funcionalizadas con la proteína p19 a través de su dominio CBD (p19-Quitina-MBs), marcaje enzimático del ds-RNA biotinilado capturado con el conjugado enzimático Estrep-HRP, y en la medida amperométrica, en presencia de H_2O_2 /HQ, tras la captura magnética de los bioconjugados resultantes, sobre SPCEs.

Un aspecto fundamental a tener en cuenta es que, con el objetivo de obtener el reconocimiento más eficiente entre la proteína p19 y los homohíbridos de RNA formados, tanto la sonda de RNA de detección como la del miRNA diana se pidieron modificadas con un grupo fosfato en el extremo 5' (como se encuentran naturalmente) para formar, tras la hibridación, un dúplex de 19 bp con extremos romos [Ye, 2003], [Vargason, 2003].

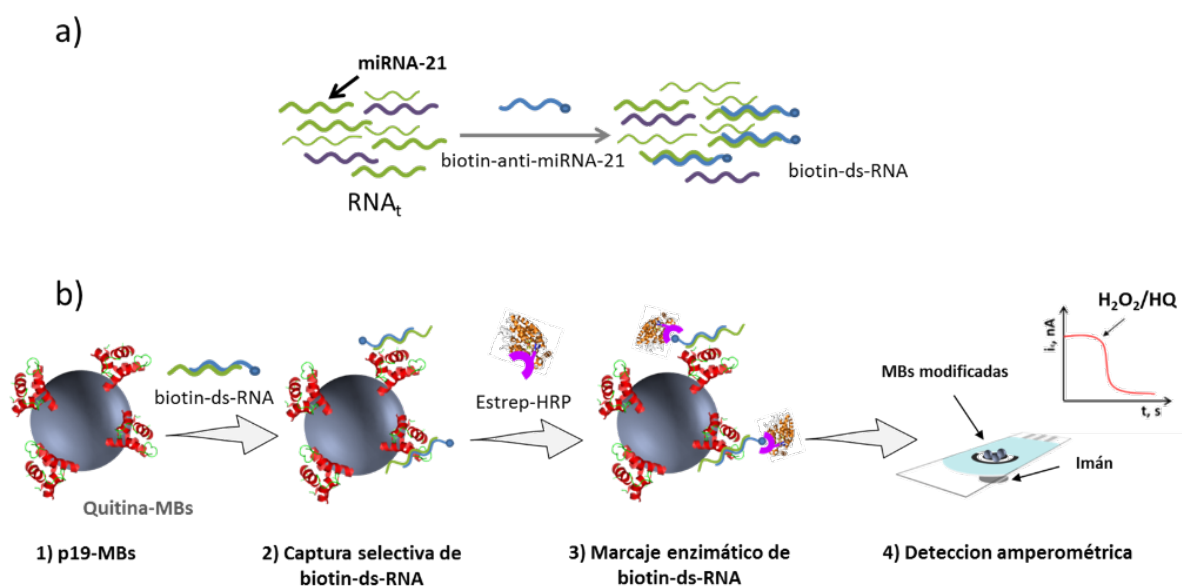


Figura 54: Etapas involucradas en la preparación del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de miRNA-21 en muestras de RNA_t . Hibridación homogénea entre el miRNA-21 contenido en la muestra de RNA_t y su sonda sintética complementaria de RNA fosforilada en el extremo 5' y biotinilada en el extremo 3' (biotin-anti-miRNA-21) para la formación de los correspondientes híbridos biotinilados (biotin-ds-RNA) (a). Etapas de modificación de las Quitina-MBs que incluyen la inmovilización de la proteína viral p19 en su superficie a través del CBD, la captura selectiva de los biotin-ds-RNA previamente formados en disolución, su marcaje enzimático con el conjugado de Estrep-HRP y la transducción amperométrica sobre SPCEs empleando el sistema H_2O_2 /HQ (b).

Previamente a la optimización de las distintas variables que afectaban al funcionamiento del biosensor propuesto, se comprobó la viabilidad de la metodología comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de 10.0 nM de miRNA-21 sintético fosforilado, obteniéndose una señal 6.4 veces superior en presencia del miRNA diana, lo que confirmó el reconocimiento selectivo del ds-RNA por parte de las p19-MBs.

4.1.2.1.1.1. Optimización de variables experimentales

De manera similar a los biosensores presentados en apartados anteriores, el criterio seleccionado para la elección de las variables experimentales más favorables se basó en la mayor relación obtenida entre las respuestas amperométricas registradas a -0.20 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag) en ausencia (B) y en presencia (S) de 10.0 nM del target sintético.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los estudios de optimización de algunas de las variables más relevantes evaluadas.

- Optimización de la concentración de biotin-anti-miRNA-21 y cantidad de proteína p19

Siguiendo las condiciones experimentales descritas en el Apdo. 3.3.1.2.1, se evaluó la influencia de la concentración de biotin-anti-miRNA-21 en un rango comprendido entre 0.0 y 1.0 μ M, y de la cantidad de p19 inmovilizada sobre las Quitina-MBs entre 0.0 y 40.0 U (**Figura 55**).

Como se observa en la **Figura 55a**, las pequeñas corrientes catódicas registradas en ausencia de biotin-anti-miRNA-21 confirman la ausencia de adsorciones inespecíficas de miRNA-21 y Estrep-HRP sobre las p19-MBs. La mayor relación S/B obtenida se alcanzó para una concentración de biotin-anti-miRNA-21 correspondiente a 0.01 μ M mientras que, para concentraciones superiores a ésta, la relación S/B disminuía progresivamente como consecuencia del incremento en las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21. Estos resultados pueden atribuirse a la adsorción inespecífica de biotin-anti-miRNA a elevadas concentraciones sobre las p19-MBs.

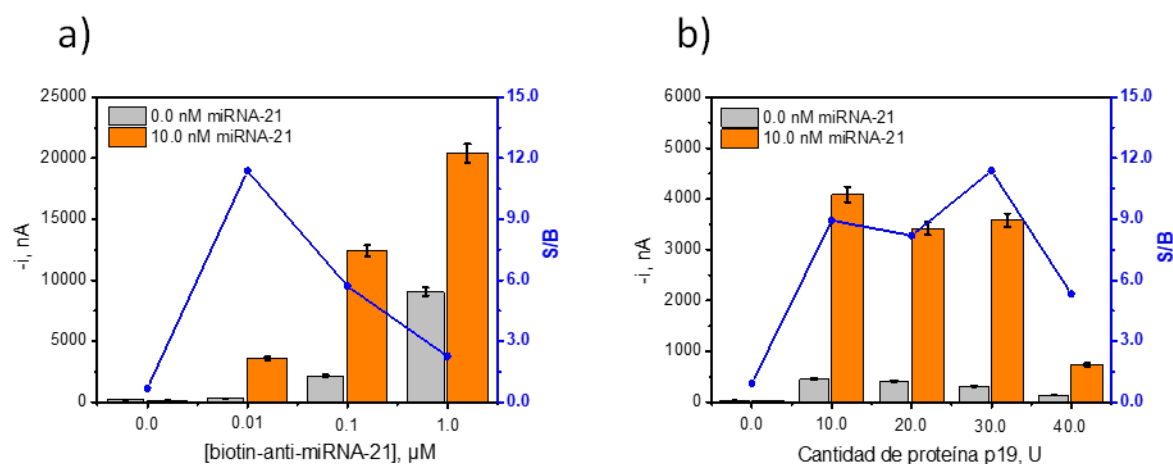


Figura 55: Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia (barras grises, B) y en presencia (barras naranjas, S) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético en función de la concentración de biotin-anti-miRNA-21 (a) y de la cantidad de proteína p19 inmovilizada sobre la superficie de las MBs (b). $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

En cuanto a la optimización de la cantidad de proteína p19 (**Figura 55b**), los resultados obtenidos demostraron la ausencia de respuestas amperométricas significativas sobre las MBs sin modificar, mientras que la relación S/B aumentaba bruscamente en presencia de p19 inmovilizada, confirmando la captura específica de los ds-RNA formados previamente en disolución, hasta un valor de 30.0 U, a partir del cual disminuía como consecuencia del reconocimiento menos eficiente de los homohíbridos de RNA debido a impedimentos estéricos en presencia de grandes cantidades de p19 inmovilizada.

A la vista de estos resultados, se seleccionó una concentración de 0.01 μM de biotin-anti-miRNA-21 y una cantidad de 30.0 U de p19 para estudios posteriores.

- Optimización del tiempo y la temperatura de hibridación miRNA-21:biotin-anti-miRNA-21

Junto con el pH y la fuerza iónica del medio, el tiempo y la temperatura resultan determinantes para asegurar la eficiencia en los procesos de hibridación entre secuencias de oligonucleótidos complementarias.

El estudio de la optimización del tiempo y temperatura del proceso de hibridación entre miRNA-21 y biotin-anti-miRNA-21 se llevó a cabo comparando las respuestas

amperométricas obtenidas variando el tiempo y la temperatura de hibridación entre 15–60 min y entre 22.5 y 65 °C, respectivamente, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 56**.

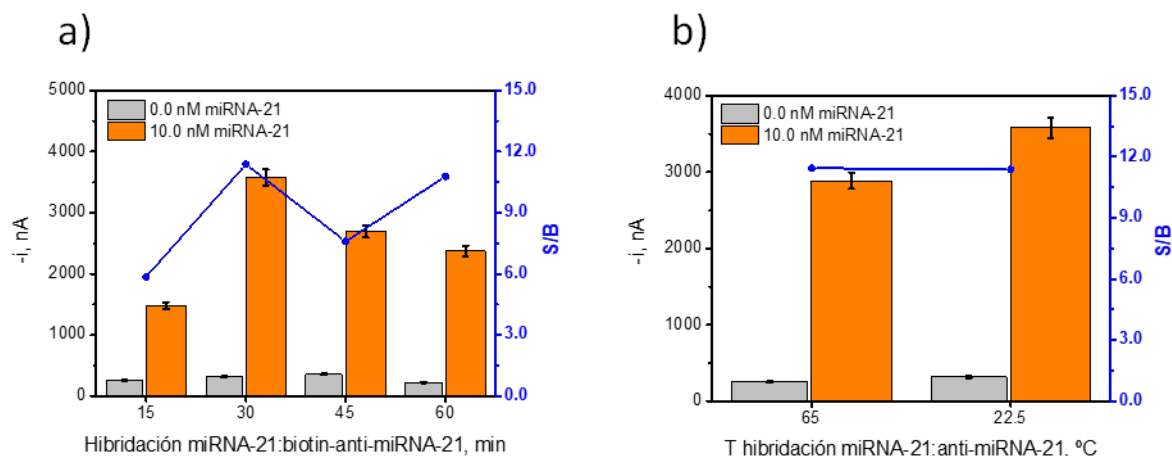


Figura 56: Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia (barras grises, B) y en presencia (barras naranjas, S) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético en función del tiempo (a) y de la temperatura (b) del proceso de hibridación entre el miRNA diana y biotin-anti-miRNA-21. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Como indican los resultados obtenidos, mientras que la mayor eficiencia del proceso de hibridación entre el miRNA-21 y biotin-anti-miRNA-21 se producía para un tiempo de incubación de 30 minutos, (**Figura 56a**), la temperatura a la cual se llevó a cabo el proceso de hibridación no se traducía en diferencias significativas en las intensidades de corriente catódica obtenidas (**Figura 56b**), lo que supone una importante ventaja de la metodología desde el punto de vista práctico ya que no requiere la aplicación de temperaturas elevadas que complicaría considerablemente su traslado a dispositivos portátiles o automatizados. Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se decidió realizar la etapa de hibridación homogénea durante 30 min y a una temperatura de 25 °C.

El resto de las variables experimentales estudiadas, junto con los correspondientes rangos evaluados para cada una de ellas y los valores seleccionados como óptimos, se resumen en la **Tabla 24**.

Tabla 24: Resumen de las variables experimentales optimizadas para el desarrollo de biosensores basados en la proteína p19 como elemento de captura para la determinación amperométrica de miRNA-21.

<i>Variable estudiada</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>[biotin-anti-miRNA-21], μM</i>	<i>0.0–1.0</i>	<i>0.01</i>
<i>Quitina-MBs, μL</i>	<i>2.5–10.0</i>	<i>2.5</i>
<i>Cantidad proteína p19, U</i>	<i>0.0–40.0</i>	<i>30.0</i>
<i>$t_{\text{hibridación miRNA-21:biotin-anti-miRNA-21}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>30</i>
<i>$t_{\text{incubación biotin-ds-RNA-p19-MBs}}$, min</i>	<i>30–180</i>	<i>60</i>
<i>Dilución Estrep-HRP</i>	<i>1:25000–1:250</i>	<i>1:1000</i>
<i>$t_{\text{incubación Estrep-HRP}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>15</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>1–2</i>	<i>2</i>

4.1.2.1.1.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales, se evaluó el comportamiento analítico del biosensor desarrollado para la determinación amperométrica del miRNA diana sintético. La curva de calibrado obtenida (**Figura 57**) demostró una relación lineal ($r = 0.997$) entre la intensidad de corriente catódica y la concentración del miRNA-21 sintético en el intervalo comprendido entre 0.14–10.0 nM, con una pendiente de $(334 \pm 5) \text{ nA nM}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $(284 \pm 22) \text{ nA}$.

Los valores para el LD y LC, calculados de acuerdo con los criterios $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, resultaron de 0.04 y 0.14 nM, respectivamente.

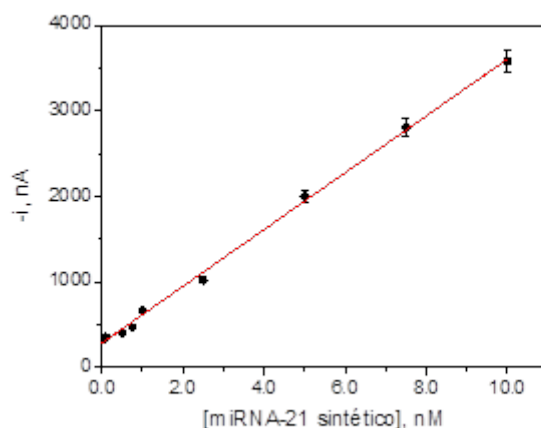


Figura 57: Curva de calibrado obtenida con el biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21 sintético. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La reproducibilidad del proceso de modificación de las MBs, captura sobre la superficie del SPCE y detección amperométrica, se evaluó comparando las respuestas proporcionadas por 5 biosensores diferentes preparados de la misma manera, para 1.0 nM de miRNA-21 sintético. El valor determinado para la desviación estándar relativa ($RSD = 3.7\%$) confirmó la robustez de la metodología desarrollada.

Asimismo, la estabilidad con el tiempo de las MBs modificadas con la proteína p19 almacenadas a 4 °C en disolución reguladora de Tris-HCl 20 mM (pH 7.0) conteniendo 100 mM de NaCl, 1.0 mM de EDTA, 1.0 mM de TCEP y 0.02 % (v/v) de Tween® 20 (1×p19) filtrada, se evaluó comparando las respuestas amperométricas proporcionadas por biosensores preparados a partir de ellas cada día de control, en presencia de 5.0 nM de miRNA-21 sintético.

El gráfico de control representado en la **Figura 58** muestra el valor medio de la intensidad de corriente catódica obtenida el primer día de estudio con 5 biosensores preparados de la misma manera, así como los límites superior e inferior correspondientes, calculados como $\pm 3s$, siendo s la desviación estándar de las medidas realizadas con los 5 biosensores diferentes preparados el primer día de estudio.

La comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados cada día de control, confirmaron la gran estabilidad de almacenamiento de las

p19-MBs que, como demuestran los resultados obtenidos, pueden prepararse con antelación y almacenarse durante al menos 45 días para la determinación sensible de miRNA-21.

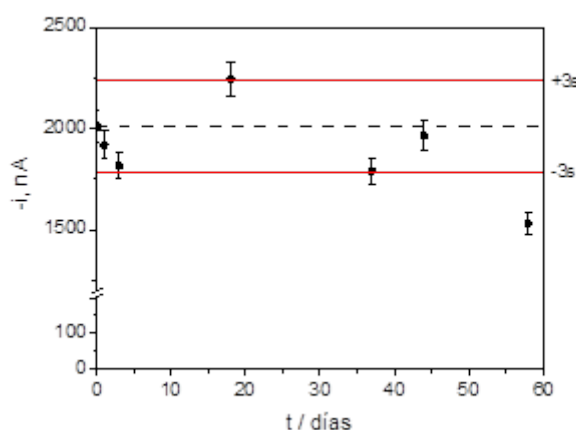


Figura 58: Gráfico de control construido para el estudio de la estabilidad de almacenamiento de las p19-MBs a 4 °C en disolución reguladora 1x p19 filtrada. Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados a partir de las p19-MBs almacenadas cada día de control para 5.0 nM de miRNA-21 sintético. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.1.2.1.1.3. Evaluación de la selectividad de la metodología

Teniendo en cuenta que dentro de una misma familia de miRNAs pueden coexistir secuencias que difieran de la secuencia objetivo en tan solo un nucleótido [Pritchard, 2012] y que, sin embargo, presenten funcionalidades totalmente distintas, la discriminación del miRNA de interés de otras secuencias homólogas resulta particularmente relevante en la determinación de estos biomarcadores.

Con este objetivo, se evaluó la selectividad de los biosensores desarrollados frente a secuencias de miRNAs no complementarias (NC), también con papel relevante en procesos cancerígenos, como el miRNA-192, y frente a secuencias complementarias con una única base desapareada en posición central (miRNA-21-1-m). Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados en presencia de 10.0 nM de las secuencias sintéticas fosforiladas correspondientes en las condiciones optimizadas, y realizando la hibridación a 25 °C. Adicionalmente, y teniendo en cuenta que el aumento de la temperatura de hibridación y la desnaturalización química son dos de los factores claves que mejoran la discriminación entre secuencias de oligonucleótidos con elevada homología [Zhang, 2012^c], también se comparó la eficiencia del proceso de hibridación para la secuencia

diana y 1-m, a 52 °C (temperatura ligeramente superior a la temperatura de fusión (T_m) del híbrido anti-miRNA:miRNA-21-1-m (48 °C), estimada mediante la herramienta informática apropiada).

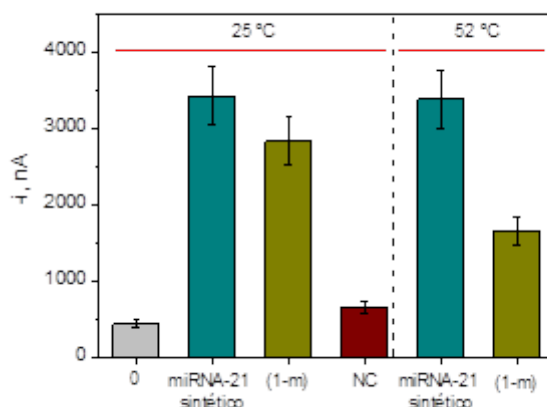


Figura 59: Caracterización de la selectividad del biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21. Señales amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 10.0 nM de miRNA-21, miRNA-21 con una base central desapareada (1-m) y miRNA-192 (NC) sintéticos a 25 y a 52 °C. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Como se observa en la **Figura 59**, a 25 °C la metodología demostró una selectividad excelente frente a secuencias NC y aceptable frente a secuencias 1-m, que, en caso necesario, puede ser mejorada sustancialmente sin comprometer la sensibilidad de la metodología aumentando la temperatura del proceso de hibridación hasta 52 °C, lo que resulta en una disminución en la eficiencia de hibridación del 83 % al 49 %, respectivamente, asumiendo una hibridación del 100 % para la secuencia diana. Además, sabiendo que la proteína p19 reconoce a los híbridos de RNA mediante interacciones producidas con los extremos del mismo, la presencia de una única base desapareada en posición central de la secuencia del miRNA diana es, probablemente, la condición menos favorable, por lo que es de esperar una mayor selectividad frente a secuencias de miRNA-21-1-m que contengan la base desapareada en posición terminal [Labib, 2013], formándose híbridos ds-RNA imperfectamente complementarios en una de las regiones preferentes de interacción p19/ds-RNA, lo que desestabilizaría significativamente la captura específica del homohíbrido de RNA.

Por otro lado, es importante destacar la escasa probabilidad de encontrar, de manera simultánea y a niveles de concentración similares, la secuencia del miRNA objetivo y la misma

secuencia de miRNA con un único nucleótido desapareado [Li, 2014^c], lo que confirma, como demostrarán los resultados de aplicabilidad, que la selectividad de los biosensores desarrollados es suficiente para asegurar determinaciones fiables del miRNA diana sin necesidad de aplicar temperaturas de hibridación superiores a 25 °C.

4.1.2.1.1.4. Aplicación al análisis de RNA_t extraído de células y tejidos

La pequeña fracción que representan los miRNAs con respecto a la masa total de RNA en una muestra dada, junto con el hecho de que su concentración pueda ser tan pequeña como del orden de unas pocas moléculas por célula y variar hasta en 4 órdenes de magnitud dependiendo tanto del número de copias del miRNA diana como del tipo de muestra analizada [Dong, 2013], hacen que la determinación fiable de miRNAs en muestras clínicas de relevancia demande metodologías de gran sensibilidad.

La aplicabilidad real de los biosensores desarrollados se demostró determinando miRNA-21 en muestras de RNA_t extraído tanto de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 [Hug, 2015], [Cissell, 2008] caracterizadas por ser estrógeno-positivas y estrógeno-negativas, respectivamente, células epiteliales no tumorigénicas MCF-10A y células de adenocarcinoma cervical humano HeLa, con cantidades indetectables de miRNA-21, como de tejidos pareados normales y tumorales de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

En primer lugar, se evaluó la existencia de efecto matriz construyendo curvas de calibrado en presencia de cantidades variables de RNA_t extraído de células MCF-7 y MCF-10A comprendidas entre 0.25 y 5.0 µg, suplementadas con concentraciones crecientes de miRNA-21 sintético (2.0–10.0 nM).

El valor de la pendiente de la curva de calibrado construida en presencia de 0.5 µg de RNA_t extraído de células MCF-7 ((332 ± 5) nA nM⁻¹) confirmó la ausencia de efecto matriz cuando se emplean cantidades de RNA_t inferiores o iguales a 1.0 µg, y que por tanto, es posible cuantificar el nivel de expresión del miRNA maduro de interés por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para las muestras analizadas, en la curva de calibrado construida para estándares de miRNA-21 sintético mostrada en la **Figura 57**.

La **Figura 60** muestra las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados para la determinación de miRNA-21 maduro en 500 ng de RNA_t extraído de líneas celulares con niveles de expresión variables de este oncomiRNA. Con fines comparativos, se muestran en la misma Figura las señales obtenidas en presencia de 1.0 nM de miRNA-21 sintético.

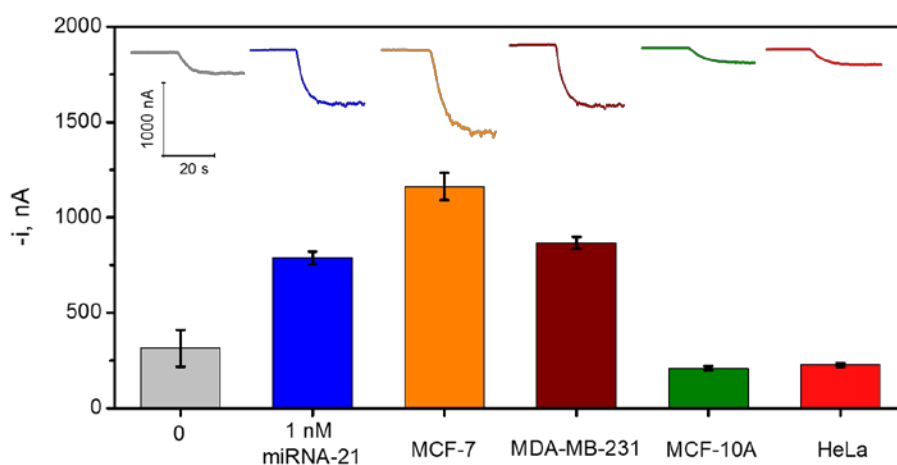


Figura 60: Determinación de miRNA-21 maduro en líneas celulares con el biosensor desarrollado. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y presencia de 1.0 nM de miRNA-21 sintético, y de 500 ng de RNA_t extraído de células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), epiteliales de mama no tumorigénicas (MCF-10A) y de cáncer cervicouterino (HeLa). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Como era de esperar, solo las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de RNA_t extraído de células MCF-7 y MDA-MB-231 resultaron significativamente superiores a las respuestas obtenidas en ausencia de miRNA diana, lo que confirma la elevada expresión de miRNA-21 maduro en este tipo de células en comparación con la que presenta en células MCF-10A y HeLa, resultados consistentes con los reportados previamente en bibliografía [Yan, 2011].

De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido endógeno de miRNA-21 maduro en células MCF-7 es de (18 ± 2) fmol μg^{-1} RNA_t, ($\text{RSD}_{n=5} = 10.4\%$).

Por otro lado, atendiendo a la complejidad de la muestra analizada y a la limitada cantidad disponible para su análisis, se evaluó la mínima cantidad de RNA_t necesaria para llevar a cabo la detección sensible de miRNA-21. Para ello, se compararon las respuestas

amperométricas proporcionadas por los biosensores desarrollados para cantidades variables de extractos de RNA_t de células MCF-7 comprendidas entre 100 y 1000 ng.

Los resultados obtenidos (**Figura 61**), confirman que es factible llevar a cabo la detección fiable de miRNA-21 maduro en tan solo 100 ng de RNA_t extraído de células MCF-7 (equivalente a 3.0×10^4 células), lo que pone de manifiesto la excelente aplicabilidad práctica de los biosensores desarrollados.

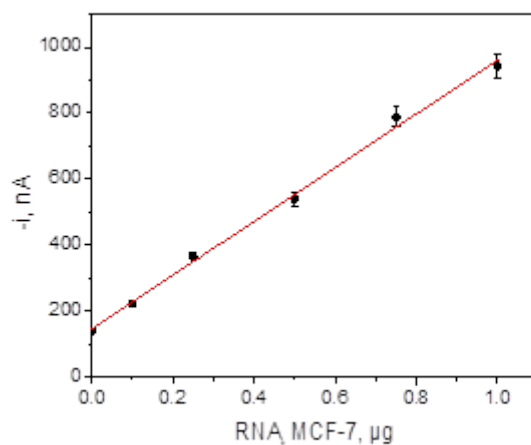


Figura 61: Dependencia de las respuestas amperométricas proporcionadas por el biosensor desarrollado para cantidades variables de RNA_t extraído de células MCF-7. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Teniendo en cuenta que en una situación analítica real el miRNA de interés coexiste con toda una variedad de miRNAs distintos en la muestra de RNA_t, se evaluó la selectividad de la metodología frente a miRNA-21 y miRNA-21-1-m sintéticos preparados en presencia de 1.0 µg de RNA_t extraído de células MCF-10A, a 25 y 52 °C, a los niveles de concentración encontrados en las células MCF-7 (18 fmol, equivalente a 2.0 nM de miRNA-21). Los resultados mostrados en la **Figura 62**, revelan discriminaciones similares a 25 °C en disolución reguladora 1×p19 y en presencia de RNA_t extraído de células MCF-10A (comparación barras 1 y 2) y confirman, nuevamente, además de la excelente selectividad de la metodología para realizar la discriminación incluso en presencia de multitud de otros miRNAs, la mejora significativa de ésta cuando la hibridación se realiza a elevada temperatura (comparación barras 2 y 3).

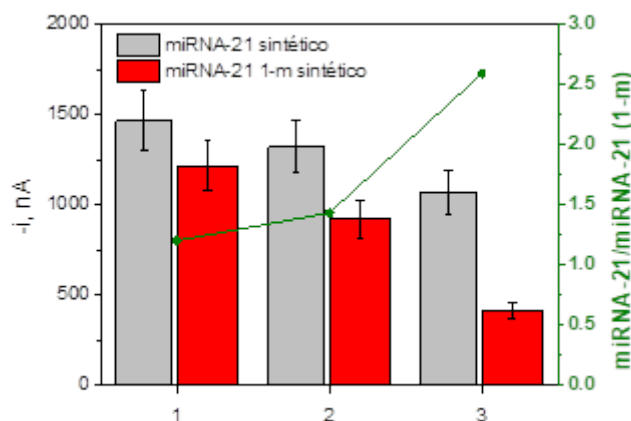


Figura 62: Comparación de la discriminación proporcionada por los biosensores desarrollados frente a secuencias de miRNA-21-1-m en disolución reguladora y en presencia de 1.0 μg de RNA_t extraído de células MCF-10A, a 25 y 52 °C. Respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones de 2.0 nM de miRNA-21 (barras grises) y miRNA-21-1-m (barras rojas) sintéticos preparados en disolución reguladora 1×10^{-9} a 25 °C (1) y en presencia de 1.0 μg de RNA_t extraído de células MCF-10A a 25 °C (2) y a 52 °C (3). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (miRNA-21/miRNA-21 (1-m)) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Adicionalmente, la metodología desarrollada se aplicó a la determinación de miRNA-21 en muestras de RNA_t extraído de tejidos frescos (tumores y pareados no tumorales) y de citologías mamarias de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

Las citologías mamarias consisten en un frotis de células cuyos métodos de recolección se basan en la punción con aguja fina, improntas y raspados. A diferencia de las biopsias sólidas, que se obtienen mediante acciones quirúrgicas y en cuya porción se observan células tumorales y gran parte del estroma circundante, la toma de muestras citológicas implica procesos rápidos, económicos y sin complicaciones médicas y, aunque no reflejan una información completa de la neoplasia, su análisis resulta extremadamente útil para obtener una aproximación diagnóstica y establecer los procedimientos clínicos futuros más adecuados para el tratamiento efectivo de la enfermedad.

La **Figura 63** muestra los resultados obtenidos para la determinación de miRNA-21 maduro en las distintas muestras de RNA_t extraído de tejidos frescos tumorales (T), sus correspondientes tejidos pareados adyacentes normales (NT), y de citología mamaria (C).

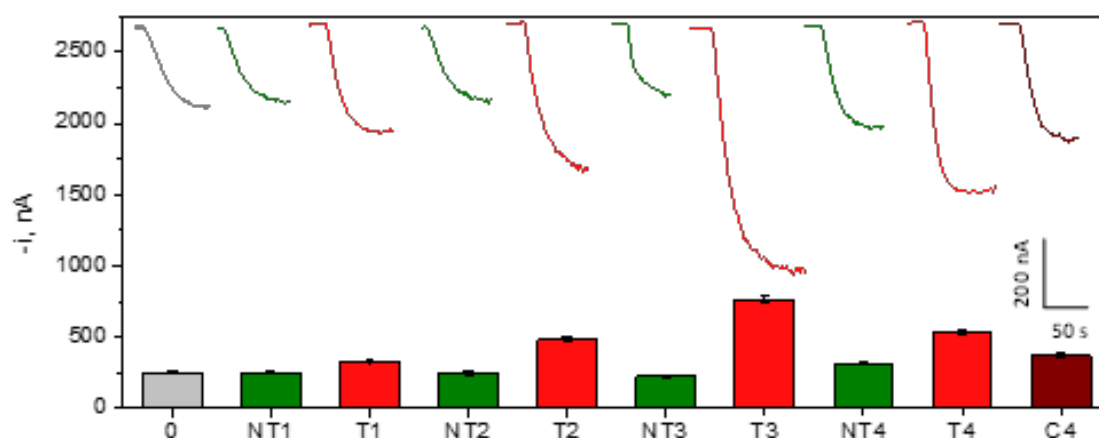


Figura 63: Determinación de miRNA-21 maduro en tejidos frescos y citologías mamarias empleando el biosensor desarrollado basado en la proteína p19 como elemento de captura. Señales amperométricas obtenidas en presencia de 1.0 μg de RNA_t extraído de tejidos tumorales (T), no tumorales (NT), y citologías (C) de mama. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La comparación de las intensidades de corriente obtenidas para cada tipo de muestra analizada, garantizan la utilidad práctica de la bioplataforma propuesta para diferenciar entre tejidos T y NT de acuerdo con el nivel de expresión de miRNA-21. Es importante destacar los resultados especialmente relevantes obtenidos para la muestra 1, para la que la menor discriminación obtenida entre T/NT se atribuyó a que esta paciente fue sometida a un tratamiento de quimioterapia antes de la cirugía. Los resultados obtenidos demuestran tanto la utilidad clínica de estos biomarcadores, cuyos niveles de expresión permiten clasificar a distintas pacientes en función del tratamiento recibido y su respuesta a los mismos, como la enorme fiabilidad de respuesta de los biosensores desarrollados, con capacidad demostrada para detectar, de manera sensible, niveles del miRNA objetivo incluso en especímenes biológicos de gran complejidad como las citologías mamarias, donde la toma de muestra es de carácter superficial.

Generalmente, en anatomía patológica, además de la práctica de biopsias para el procesamiento de muestras, la incrustación en parafina y fijación con formalina es uno de los métodos más comúnmente empleados para la preparación y preservación a largo plazo de archivos de muestras de tejidos, cuyo análisis ofrece una perspectiva histórica y una vasta información acerca de la evolución de una enfermedad concreta [Ripoli, 2016]. Gracias a la formalina y a la cera, empleadas como estabilizantes, las estructuras más frágiles de la muestra se conservan fácilmente y resultan ideales para el diagnóstico de cáncer. Contrariamente a los tejidos frescos, los tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina (FFPE) no requieren temperaturas ultra-frías para su conservación, aunque por otro lado, puede que parte de las proteínas y ácidos nucleicos presentes en la muestra se degraden parcialmente limitando la utilidad de estas muestras para ciertos tipos de estudios.

Uno de los mayores retos a los que pueden enfrentarse los biosensores electroquímicos es la posibilidad de ser empleados como herramientas sencillas para la detección precisa de todo tipo de biomarcadores, también en este tipo de especímenes parafinados conservados durante periodos prolongados. Así, una vez demostrada la excelente aplicabilidad para la determinación en RNA_t extraído de tejidos frescos, teniendo en cuenta que, de acuerdo con su fundamento, la metodología desarrollada puede trasladarse a la detección de cualquier miRNA seleccionando adecuadamente la secuencia de biotin-anti-miRNA correspondiente, que la monitorización de distintos miRNAs en el mismo entorno tumoral resulta de enorme utilidad en la elaboración de diagnósticos clínicos con fiabilidad mejorada, y con el objetivo de ampliar el abanico de aplicabilidad de los biosensores desarrollados, éstos se aplicaron a la determinación del oncogén miRNA-21 y del supresor tumoral miRNA-205 en 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos FFPE tumorales de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, y de células MCF-10A como control negativo y positivo para miRNA-21 y miRNA-205, respectivamente.

Los resultados obtenidos (**Figura 64**) ponen claramente de manifiesto la utilidad de los biosensores desarrollados también para la determinación de miRNAs en este tipo de muestras, observándose, de acuerdo con lo esperado, hiperexpresión de miRNA-21 y expresión reducida de miRNA-205 en las células y tejidos cancerígenos, en comparación con la observada en tejidos sanos y células no tumorales.

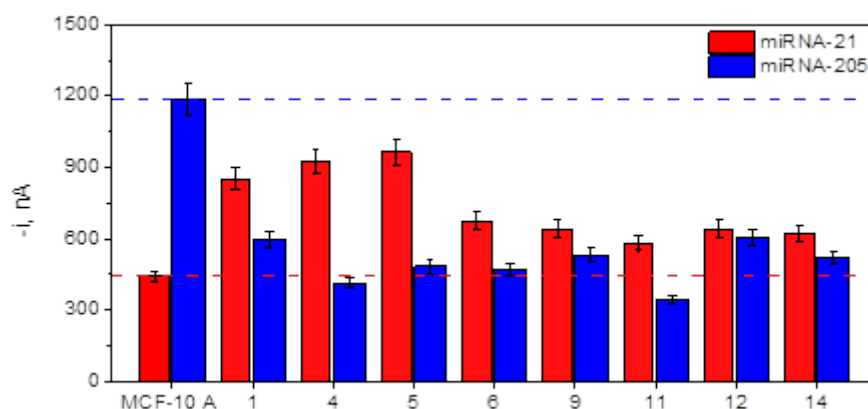


Figura 64: Detección individual de miRNA-21 y miRNA-205 maduros en RNA_t extraído de tejidos FFPE tumorales de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama (1-14) y de células MCF-10A. Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en presencia de 1.0 µg de RNA_t extraído de cada muestra. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Con fines comparativos se muestran también los niveles de expresión observados en células MCF-10A para miRNA-21 (---) y miRNA-205 (---).

El conjunto de resultados experimentales obtenidos con los biosensores desarrollados revelan las excelentes características que ofrecen, siendo capaces de determinar 0.4 fmoles del miRNA diana sintético, operar a temperatura ambiente con gran efectividad, y utilidad real demostrada para la determinación fiable del contenido endógeno de miRNAs diana en extractos crudos de RNA_t extraídos de lisados celulares, tejidos frescos e incrustados en bloques de parafina y citologías biológicas, sin necesidad de aplicar etapas previas de amplificación, purificación y pre-concentración. Es importante destacar que las determinaciones se realizan de manera sencilla, con tiempos reducidos de análisis (inferior a 2 h) y empleando cantidades moderadas de muestra (0.5–1.0 µg RNA_t).

Además, es importante resaltar la versatilidad que muestra esta plataforma para la biosensorización de cualquier miRNA simplemente empleando la secuencia de biotin-anti-miRNA adecuada, con prestaciones similares para la determinación de todos ellos, lo que ofrece un abanico tremendo de posibilidades en la fabricación de arrays de alto rendimiento que permitan interrogar perfiles de expresión de estos biomarcadores característicos de cada tipo de neoplasia o de la etapa de su desarrollo, en células, tejidos y otros especímenes clínicos complejos.

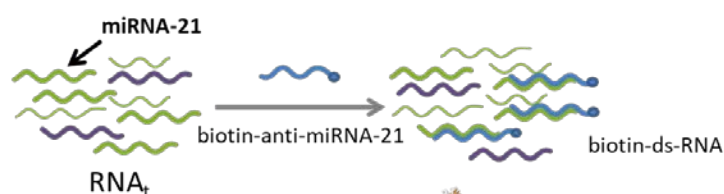
4.1.2.1.2. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO UNA PROTEÍNA VIRAL COMO ELEMENTO DE DETECCIÓN

Los resultados de este apartado se corresponden con los del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Direct determination of miR-21 in total RNA extracted from breast cancer samples using magnetosensing platforms and the p19 viral protein as detector bioreceptor. Electroanalysis 26 (2014) 2080–2087*, adjuntado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

La versatilidad que ofrece la proteína p19 recombinante comercial se exploró también en el desarrollo de otra estrategia para la determinación electroquímica de miRNAs en la que dicha proteína se emplea como bio-receptor de detección en vez de captura.

En este caso la estrategia desarrollada implica una primera etapa de hibridación homogénea del miRNA diana con la sonda complementaria de RNA de 19 nts biotinilada y fosforilada. A continuación, esta mezcla de hibridación se suplementa con la proteína p19 que reconoce selectivamente los homohíbridos de RNA (ds-RNA) formados previamente en disolución y, aprovechando la interacción biotina-estreptavidina, el conjunto biotin-ds-RNA-p19 se inmoviliza sobre Estrep-MBs. Posteriormente, la p19 capturada sobre las MBs a través de la MBP a la que está fusionada, se marca enzimáticamente con un anticuerpo comercial conjugado con HRP y específico para esta proteína (**Figura 65**). La transducción se realiza nuevamente por amperometría tras la captura de los bioconjugados magnéticos preparados sobre la superficie de SPCEs empleando el sistema H_2O_2/HQ .

a)



b)

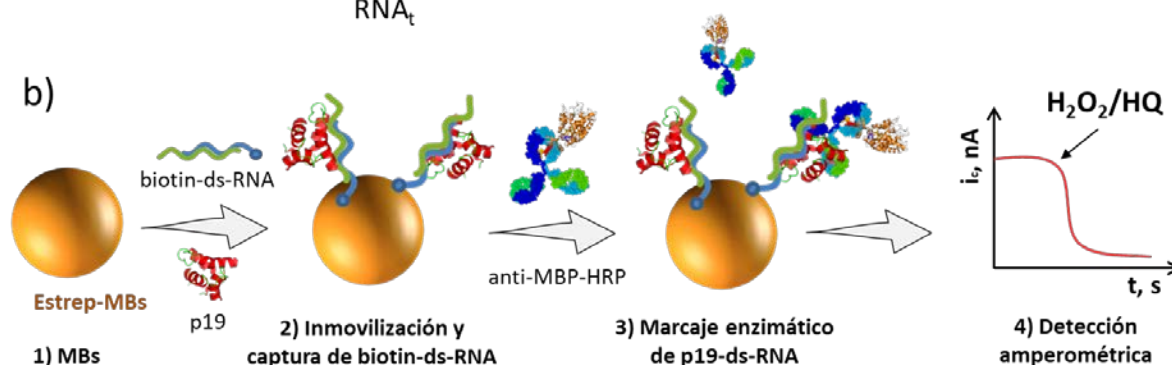


Figura 65: Etapas involucradas en la preparación del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de miRNA-21 empleando la proteína p19 como bio-receptor de detección. Hibridación homogénea entre el miRNA-21 contenido en la muestra de RNA_t y su sonda sintética complementaria de RNA fosforilada en el extremo 5' y biotinilada en el extremo 3' (biotin-anti-miRNA-21) para formar los homodúplex de RNA biotinilados correspondientes (biotin-ds-RNA) (a). Incubación de las Estrep-MBs con la mezcla de hibridación suplementada con la p19 para la captura selectiva del conjunto biotin-ds-RNA-p19 sobre su superficie, marcaje enzimático de la p19 capturada a través de la MBP a la que está fusionada con anticuerpos anti-MBP-HRP y detección amperométrica sobre SPCEs empleando el sistema H₂O₂/HQ (b).

Es importante destacar nuevamente, y tal y como demuestran los resultados mostrados en la **Figura 66**, la necesidad de trabajar con sondas fosforiladas en el extremo 5' para asegurar el reconocimiento eficiente de los homodúplex de ds-RNA.

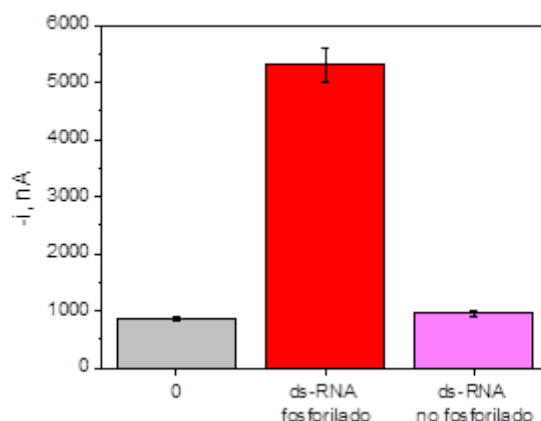


Figura 66: Comparación entre las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados en ausencia (barra gris) y en presencia (barras roja y rosa) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético empleando 0.1 μ M de sondas biotiniladas (en 3') de RNA complementarias fosforiladas (en 5') (barras gris y roja) y sin fosforilar (barra rosa). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (barra gris) y en presencia (barra roja) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético empleando 0.1 μ M de sondas de RNA complementarias biotiniladas y fosforiladas confirma la viabilidad de la estrategia propuesta y que la respuesta obtenida se debe únicamente al reconocimiento de los homohíbridos de RNA fosforilados por la p19 y de ésta por los anticuerpos anti-MBP-HRP.

4.1.2.1.2.1. Optimización de variables experimentales

Tomando como criterio de selección la mayor relación obtenida entre las respuestas amperométricas registradas a -0.20 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag) con los biosensores preparados en ausencia (B) y en presencia (S) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético, se optimizaron las variables fundamentales involucradas en el funcionamiento de la estrategia propuesta, que se resumen en la en la **Tabla 25** junto con los rangos evaluados y los valores seleccionados como óptimos para cada una de ellas.

Tabla 25: Resumen de los resultados obtenidos en la optimización de las variables experimentales que afectan al funcionamiento del biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21 empleando la proteína p19 como bio-receptor de detección.

<i>Variable estudiada</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>[biotin-anti-miRNA-21], μM</i>	<i>0.0–10.0</i>	<i>0.1</i>
<i>Estrep-MBs, μg (μL)</i>	<i>25–100 (2.5–10.0)</i>	<i>50 (5.0)</i>
<i>Cantidad proteína p19, U</i>	<i>0.0–40.0</i>	<i>30.0</i>
<i>$t_{\text{hibridación miRNA-21:biotin-anti-miRNA-21}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>30</i>
<i>$t_{\text{incubación p19-ds-RNA-MBs}}$, min</i>	<i>15–90</i>	<i>15</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>1–3</i>	<i>2</i>
<i>Dilución anti-MBP-HRP</i>	<i>1:10000–1:500</i>	<i>1:1000</i>
<i>$t_{\text{incubación anti-MBP-HRP}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>15</i>

A modo de ejemplo se describen y discuten los resultados obtenidos en los estudios de optimización del número de etapas involucradas en el desarrollo del biosensor propuesto y de la dilución aplicada a la disolución comercial del anticuerpo anti-MBP-HRP (**Figura 67**).

- Optimización del número de etapas y de la dilución del anticuerpo anti-MBP-HRP

Con objeto de simplificar al máximo la metodología desarrollada y reducir el tiempo de análisis conservando las mejores prestaciones analíticas, se evaluaron distintos protocolos de preparación del biosensor, consistentes en: (1) una única etapa de 30 minutos de incubación de las Estrep-MBs con las mezclas de hibridación ds-RNA (previamente formadas en disolución) suplementadas con las concentraciones óptimas de proteína p19 y anticuerpo anti-MBP-HRP; (2A) dos etapas sucesivas de 30 minutos de incubación cada una, primero las Estrep-MBs con las mezclas de hibridación ds-RNA, y después las ds-RNA-MBs con disoluciones mezcla de proteína p19 y anticuerpo anti-MBP-HRP; (2B) dos etapas consecutivas de 30 minutos cada una, primero las Estrep-MBs con las mezclas de hibridación ds-RNA suplementadas con la proteína p19, y después las p19-ds-RNA-MBs con una disolución de anticuerpo anti-MBP-HRP; (3A) tres etapas de incubación sucesivas de 30 minutos cada una, en primer lugar las Estrep-MBs con los híbridos ds-RNA, después las ds-RNA-MBs con la proteína p19, y por último las p19-ds-RNA-MBs con el anticuerpo anti-MBP-

HRP y, (3B) tres etapas secuenciales de 30 minutos cada una, primero las Estrep-MBs con la sonda biotinilada y fosforilada de RNA complementaria, seguido de las biotin-anti-miRNA-21-MBs con una disolución mezcla del miRNA-21 diana y la proteína p19, y por último las p19-ds-RNA-MBs con la disolución del anticuerpo anti-MBP-HRP.

Como puede observarse, los resultados obtenidos (**Figura 67a**), demostraron que los protocolos designados como (2B) y (3A) proporcionaron la mayor relación S/B, mientras que los protocolos (1) y (2A) proporcionaban la menor discriminación entre las respuestas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de miRNA-21 sintético. Estos resultados pueden atribuirse a las restricciones conformacionales que sufre la p19 para el reconocimiento de los ds-RNAs una vez conjugada con el anti-MBP-HRP [Nasheri, 2011].

La comparación de los resultados obtenidos empleando los protocolos designados como (3A) y (3B) también permite concluir que la captura específica de los ds-RNA resultaba más eficiente cuando los homohíbridos se formaban por hibridación homogénea en disolución, y no sobre la superficie de las MBs modificadas previamente con biotin-anti-miRNA-21.

En cuanto a la concentración de anti-MBP-HRP, su influencia se evaluó comparando las respuestas amperométricas obtenidas variando la dilución aplicada a la disolución comercial de anti-MBP-HRP entre 1:10000 y 1:500. Tal y como se observa en la **Figura 67b**, la relación S/B aumentaba con la concentración de anti-MBP-HRP hasta una dilución de 1:1000 y disminuía para concentraciones superiores como consecuencia del aumento significativo que se producía en las respuestas inespecíficas.

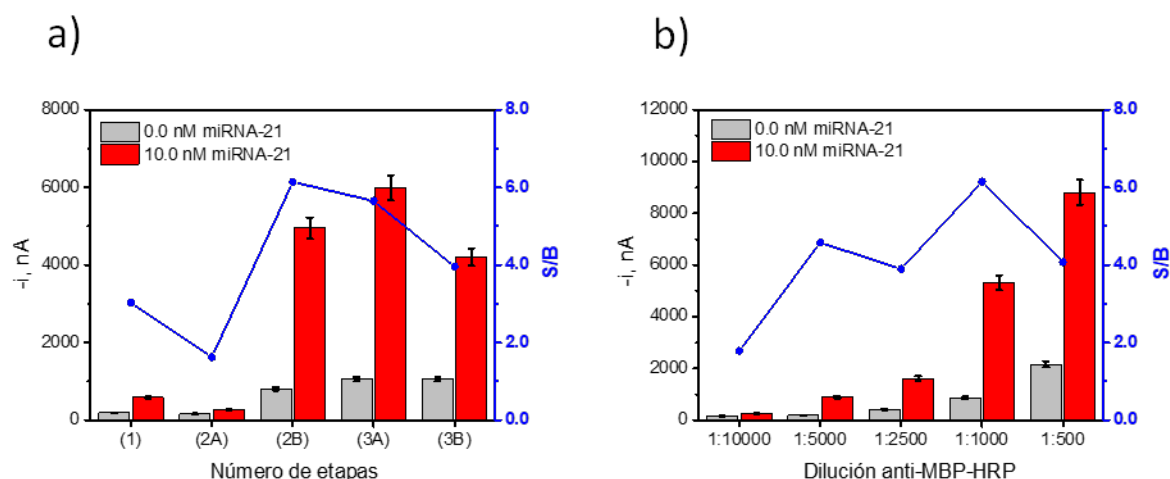


Figura 67: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia (barras grises, B) y en presencia (barras rojas, S) de 10.0 nM de miRNA-21 sintético con el número de etapas involucradas en la metodología desarrollada (a) y la dilución del anticuerpo anti-MBP-HRP (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.2.1.2.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad

La curva de calibrado construida a partir de las respuestas amperométricas obtenidas con biosensores fabricados empleando las condiciones optimizadas para concentraciones crecientes de miRNA-21 sintético, representada en la **Figura 68**, demostró la dependencia lineal ($r = 0.998$) entre los valores de intensidad de corriente catódica obtenida y la concentración de miRNA-21 sintético, en el intervalo comprendido entre 1.4 y 10.0 nM, con valores de pendiente y ordenada en el origen de $(446 \pm 13) \text{ nA nM}^{-1}$ y $(943 \pm 76) \text{ nA}$, respectivamente.

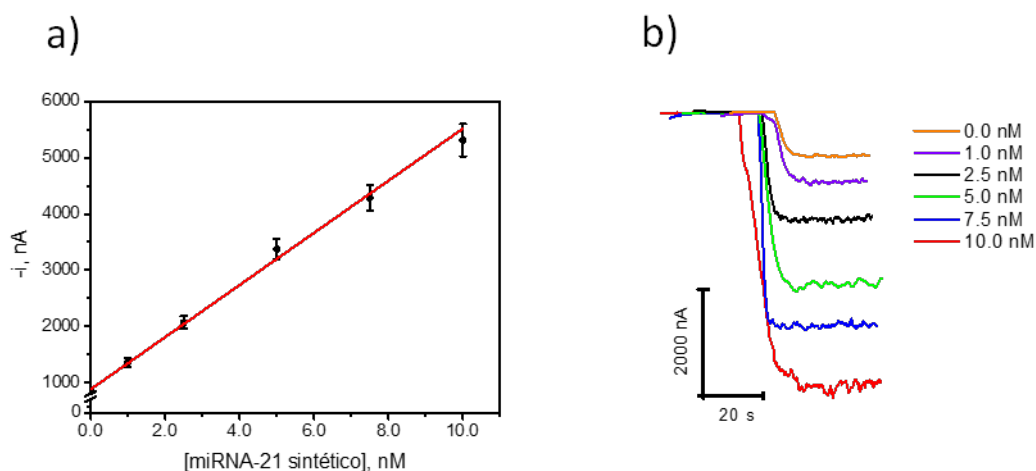


Figura 68: Curva de calibrado obtenida con biosensores preparados en las condiciones optimizadas para disoluciones de concentración creciente de miRNA-21 sintético (a) y registro de las señales amperométricas obtenidas (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La buena reproducibilidad de los procesos de preparación y obtención de respuesta de los biosensores quedó demostrada a partir del valor de RSD obtenido (5.4 %) con 5 biosensores diferentes preparados de la misma manera, para concentraciones de miRNA-21 sintético de 5.0 nM.

Por otro lado, y de acuerdo con el fundamento de preparación de la plataforma propuesta, puesto que la primera etapa ya conlleva la incubación con el miRNA diana, en este caso no es posible llevar a cabo la funcionalización de los soportes magnéticos con antelación ni evaluar su estabilidad de almacenamiento.

El LD calculado de acuerdo con el criterio $3 \times s_b / m$, siendo s_b la desviación estándar de medidas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21 con 10 biosensores diferentes preparados de la misma manera, y m la pendiente de la curva de calibrado para estándares de miRNA sintético (**Figura 68a**), resultó de 0.42 nM que, como se demostrará en apartados posteriores, es suficiente para cuantificar, de forma precisa y sin amplificación previa, el contenido endógeno de miRNA-21 en muestras de RNA_t extraído de lisados celulares, tejidos y citologías.

Aunque hasta la fecha se han desarrollado numerosas estrategias electroquímicas para la determinación de miRNAs que presumen de unos LD significativamente inferiores al que proporciona esta metodología [Miao, 2016], [Hu, 2018], [Chen, 2018^b], todas ellas requieren largos protocolos de preparación, estrategias de amplificación de la señal, y/o diversos nanomateriales y nanoestructuras que encarecen y dificultan la fabricación final del dispositivo, haciéndolo poco apropiado para su implementación en dispositivos que permitan determinaciones en el punto de atención. En este sentido, la sencilla fabricación y el reducido tiempo de análisis del biosensor propuesto (60 minutos), lo hacen especialmente atractivo para responder a estas demandas.

Con objeto de realizar determinaciones incluso en menor tiempo, se evaluaron las respuestas que proporcionaban los biosensores desarrollados para estándares de miRNA-21 de concentración creciente realizando las etapas de hibridación homogénea y formación de los ds-RNA, inmovilización y captura simultánea de los p19-ds-RNA sobre la superficie de las Estrep-MBs y marcaje enzimático de la p19 con anti-MBP-HRP, durante periodos de incubación secuenciales de 5 minutos, respectivamente, lo que permitía reducir el tiempo total de ensayo de 60 a tan solo 15 minutos. La curva de calibrado obtenida con biosensores preparados en estas condiciones (**Figura 69**), aunque presentaba una sensibilidad inferior a la obtenida empleando el protocolo optimizado ((195 ± 5) vs. (446 ± 13) nA nM⁻¹), todavía resultaba adecuada para la determinación en el mismo rango lineal, lo que demostró la posibilidad de realizar la determinación, en 15 minutos, de miRNAs de elevado número de copias o cuando la cantidad de muestra no sea limitante. El empleo de una herramienta de este tipo resultaría particularmente útil en determinadas situaciones clínicas en las que la detección rápida de este tipo de biomarcadores se considera vital, por ejemplo, cuando el especialista necesita definir con elevada precisión los bordes de escisión de un tumor.

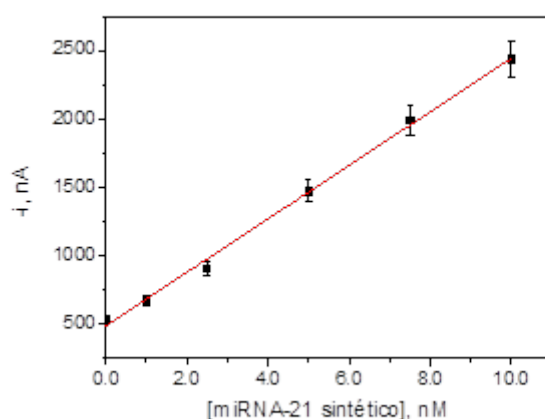


Figura 69: Curva de calibrado obtenida para la determinación de estándares de miRNA-21 sintético con biosensores preparados en un tiempo total de 15 minutos. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.1.2.1.2.3. Evaluación de la selectividad de la metodología

La selectividad de esta metodología se evaluó exhaustivamente frente a secuencias fosforiladas no complementarias (NC) y con solo una base desapareada en posición central (miRNA-21-1-m).

La **Figura 70** muestra la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con biosensores preparados en las condiciones óptimas, en ausencia y en presencia de 5.0 nM de secuencias sintéticas de miRNA-21, miRNA-21-1-m y miRNA-192 (NC).

Nuevamente, asumiendo una eficiencia de hibridación del 100 % para el miRNA diana sintético, ésta disminuía al 63 % para secuencias de miRNA-21-1-m, confirmando una discriminación aceptable.

Por otro lado, la respuesta amperométrica obtenida para secuencias NC (miRNA-192), similar a la obtenida en ausencia de miRNA-21, confirmaron la excelente selectividad de la metodología frente a este tipo de secuencias.

Una posible explicación a la mejora observada en la discriminación frente a secuencias de miRNA-21-1-m que ofrece esta metodología (63 %), en comparación con la que proporciona la estrategia que emplea la proteína p19 como elemento de captura inmovilizada sobre partículas magnéticas de quitina (83 %), se basa en el papel que desempeña el elemento de reconocimiento en cada tipo de estrategia. Mientras que la p19 inmovilizada sobre MBs

seguramente adopte una conformación tal que permita una peor discriminación frente a híbridos de ds-RNA-1-m, por el contrario, es posible que el reconocimiento de los ds-RNA por la p19 sea más riguroso cuando este fenómeno ocurre en disolución, lo que se traduce en una mayor discriminación frente a secuencias de miRNAs de elevada homología cuando la p19 se emplea como bio-receptor de detección.

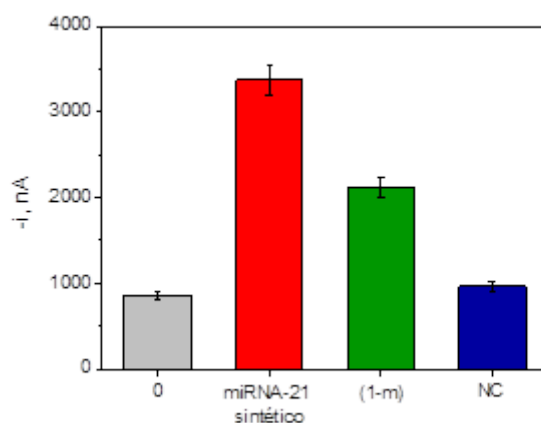


Figura 70: Caracterización de la selectividad del biosensor desarrollado. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 5.0 nM de miRNA-21, miRNA-21 con una base central desapareada (1-m) y miRNA-192 (NC) sintéticos. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Al igual que en el biosensor desarrollado empleando la p19 como bio-receptor de captura, también se evaluó la influencia de la temperatura (25 °C vs. 52 °C) y el medio de hibridación (disolución reguladora 1×p19 vs. 1.0 µg de RNA_t de células no tumorigénicas MCF-10A) en la discriminación frente a secuencias 1-m. Los resultados obtenidos (**Figura 71**) indicaron que, aunque el aumento de la temperatura del proceso de hibridación no mejoró significativamente la discriminación frente a secuencias 1-m en comparación con la obtenida a 25 °C (72 % vs. 63 %), la presencia de otras secuencias de RNA contenidas en la matriz de las células MCF-10A incrementaron notablemente la selectividad frente a secuencias de miRNA-21-1-m, reduciéndose la eficiencia de la hibridación con la secuencia 1-m al 53 %.

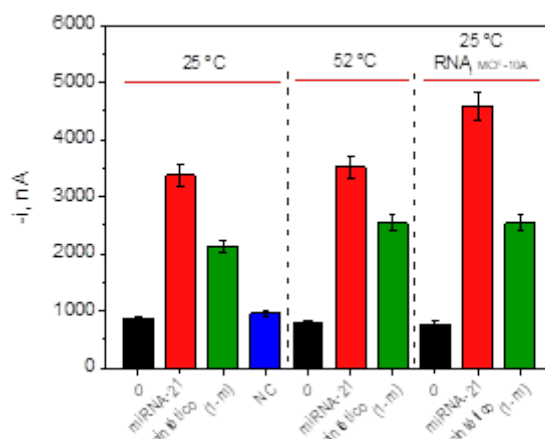


Figura 71: Caracterización de la selectividad del biosensor desarrollado para 1-m variando la temperatura y el medio de hibridación. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 5.0 nM de miRNA-21, miRNA-21 con una base central desapareada (1-m) y miRNA-192 (NC) sintéticos preparados en disolución reguladora 1×p19 en ausencia o en presencia de 1.0 µg de RNA_t extraído de células MCF-10A y realizando la hibridación homogénea a 25 o a 52 °C. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

Por otra parte, teniendo en cuenta la posibilidad de reducir el tiempo de hibridación, también se caracterizó la selectividad del biosensor desarrollado, a 25 °C, empleando tiempos de hibridación homogénea de 5, 15 y 30 minutos, y llevando a cabo el resto de las etapas involucradas en el ensayo en las condiciones optimizadas.

La **Figura 72** indica una mínima variación en las intensidades de corriente obtenidas frente a secuencias NC para distintos tiempos de hibridación, y una discriminación adecuada (70 %) frente a secuencias de miRNA-21-1-m incluso cuando el proceso de hibridación se llevó a cabo durante tan solo 5 minutos. La discriminación hacia secuencias 1-m mejoraba ligeramente con el aumento del tiempo de hibridación, obteniéndose unos porcentajes del 65 y 63 %, para 15 y 30 minutos, respectivamente.

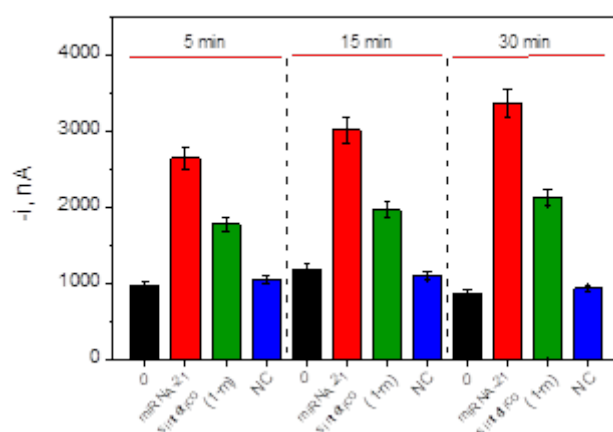


Figura 72: Evaluación de la selectividad del biosensor desarrollado variando el tiempo de hibridación homogénea. Comparación de las señales amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 5.0 nM de miRNA-21, miRNA-21 con una base desapareada en posición central (1-m) y miRNA-192 (NC) sintéticos realizando la etapa de hibridación homogénea a 25 °C durante 5, 15 y 30 minutos. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Es importante resaltar que la selectividad de las estrategias desarrolladas basadas en el empleo de la proteína viral p19, tanto como bio-receptor de captura como de detección, reside en la combinación de la elevada especificidad de los procesos de hibridación y la gran afinidad de la proteína p19 para reconocer selectivamente homohíbridos de RNA de un determinado tamaño (19–22 bp) y no secuencias sencillas de DNA, RNA, híbridos DNA–DNA y DNA–RNA e híbridos RNA–RNA de un tamaño superior.

4.1.2.1.2.4. Aplicación al análisis de RNA_t extraído de células y tejidos

Para demostrar su utilidad práctica, estos biosensores se aplicaron a la determinación del contenido endógeno del miRNA diana en extractos de RNA_t de células (células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, correspondientes a los subtipos moleculares ER⁺ y TNBC [Shi, 2017^b], respectivamente, células HeLa, y células epiteliales no tumorigénicas MCF-10A) y de tejidos frescos y citologías mamarias, empleando cantidades de muestra comprendidas entre 500–1000 ng de RNA_t y los mismos protocolos optimizados previamente para la determinación del miRNA diana sintético.

Las respuestas amperométricas obtenidas para los extractos de RNA_t celulares (**Figura 73**), concordantes con las proporcionadas por las bioplateformas basadas en el empleo de la proteína p19 como elemento de captura (Apdo. 4.1.2.1.1), confirmaron nuevamente la hiperexpresión del miRNA maduro diana solo en las células de cáncer de mama.

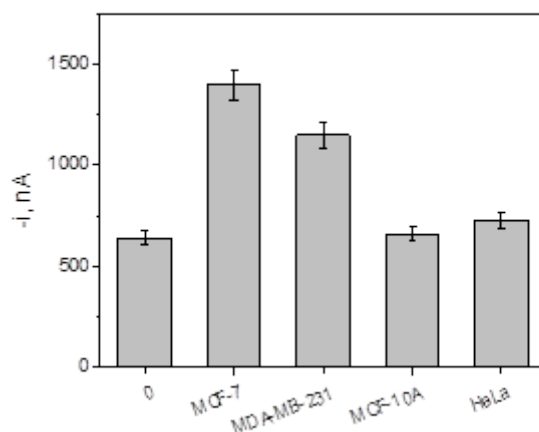


Figura 73: Determinación del contenido endógeno de miRNA-21 maduro en RNA_t extraído de distintos tipos celulares empleando el biosensor desarrollado. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21 sintético (0) y en presencia de 500 ng de RNA_t extraído de células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), epiteliales no tumorigénicas (MCF-10A) y de cáncer cervicouterino (HeLa). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Confirmada nuevamente la ausencia de efecto matriz para cantidades de RNA_t inferiores a 1.0 μ g, la determinación del contenido endógeno de miRNA-21 se llevó a cabo por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra en la curva de calibrado construida para estándares de miRNA-21 sintético (**Figura 68a**), obteniéndose contenidos del oncomiRNA-21 de 21.7 y 11.9 amol ng^{-1} de RNA_t ($\text{RSD}_{(n=3)} = 10.7\%$), en células MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente.

En cuanto a la determinación en RNA_t extraído de tejidos frescos tumorales y de una muestra de citología mamaria, como demuestran los resultados de la **Figura 74**, los biosensores desarrollados permitían detectar claramente la hiperexpresión de miRNA-21 empleando 1.0 μ g de RNA_t extraído de tejidos tumorales (T) y citologías mamarias (C).

Es importante destacar que, en todos los casos, la relación entre los niveles de expresión de miRNA-21 encontrado en tejidos tumorales (T) respecto a sus correspondientes pareados no tumorales (NT) resultaron concordantes con los descritos por otros autores (1.557–2.449) [Savad, 2012] empleando metodologías mucho más complejas y laboriosas.

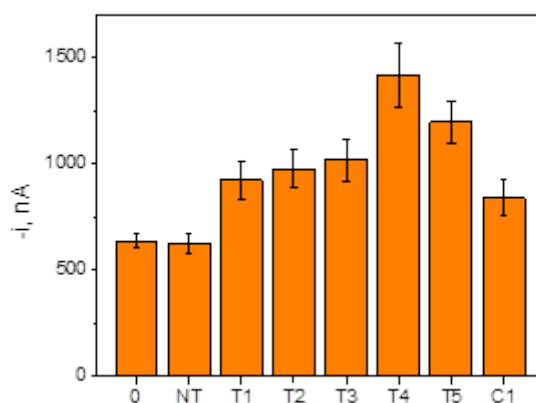


Figura 74: Determinación del contenido endógeno de miRNA-21 maduro en RNA_t extraído de tejidos frescos y citologías mamarias de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama empleando el biosensor desarrollado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21 sintético (0) y en presencia de 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos frescos tumorales (T), sus pareados no tumorales (NT), y citologías mamarias (C). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

Finalmente, y una vez demostrada la posibilidad de determinar el miRNA diana en tan solo 15 minutos, también se evaluó la aplicabilidad práctica de los biosensores desarrollados forzando su capacidad de respuesta a este tiempo reducido de análisis. Los resultados que se muestran en la **Figura 75** confirmaron la posibilidad de realizar la discriminación en estas condiciones.

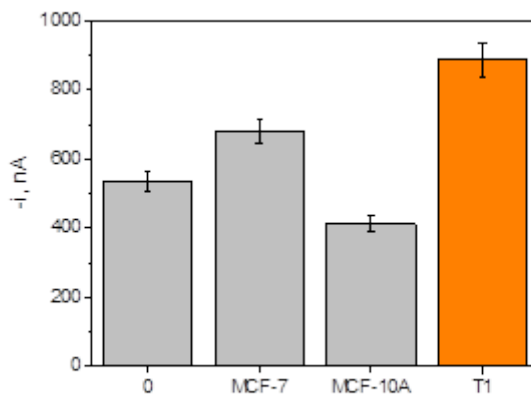


Figura 75: Determinación de miRNA-21 maduro en RNA_t extraído de células y tejidos frescos de mama empleando biosensores fabricados en un tiempo total de ensayo de 15 minutos. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21 sintético (0) y en presencia de RNA_t extraído de células MCF-7 y MCF-10A (500 ng), y de un tejido tumoral (T) fresco (1.0 μg) de una paciente diagnosticada con cáncer de mama. $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Estos resultados de aplicabilidad demuestran la fiabilidad y utilidad clínica del biosensor desarrollado basado en el empleo de la proteína viral p19 como bio-receptor de detección para discriminar, empleando tiempos de ensayo comprendidos entre 15 y 60 minutos y a través del nivel de expresión del oncomiRNA-21, entre muestras tumorales y no tumorales de diferente naturaleza (células, tejidos y citologías mamarias) sin etapas previas de amplificación y utilizando protocolos sencillos que operan a temperatura ambiente e instrumentación de coste asequible y fácilmente miniaturizable.

4.1.2.2. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS

4.1.2.2.1. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS COMO BIO-RECEPTORES DE CAPTURA

En este apartado se discuten los resultados de los artículos *Torrente-Rodríguez et al. Fast electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody-functionalized magnetic microcarriers. ACS Sensors 1 (2016) 896–903* y *Torrente-Rodríguez et al. Electrochemical miRNAs determination in formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumor*

tissues association with HER2 expression. JSM Biotechnology & Biomedical Engineering 3(4): 1064, incluidos como anexos al final de esta Tesis Doctoral.

La producción de anticuerpos de elevada especificidad frente a una gran variedad de polinucleótidos y combinaciones de los mismos, de cadena sencilla y doble, incluyendo principalmente heterohíbridos de tipo DNA–RNA, independientemente de la secuencia de bases que los conformen [Boguslawski, 1986], ha permitido explotar las excelentes propiedades de estas biomoléculas de afinidad para el reconocimiento específico de este tipo de heterohíbridos, y por extensión, a la determinación de miRNAs.

Así, se ha desarrollado por primera vez, una plataforma biosensora amperométrica para la determinación sensible y selectiva de miRNAs, basada en el empleo de ProtG-MBs, anticuerpos selectivos a heterohíbridos de tipo DNA–RNA (Ab S9.6), secuencias específicas de DNA biotiniladas en el extremo 3' y complementarias a la secuencia del miRNA diana objetivo (b-anti-DNA), Estrep-HRP como conjugado enzimático, y SPCEs como transductores electroquímicos.

El proceso de modificación de las ProtG-MBs y fabricación de los biosensores basados en Ab S9.6 como elementos de captura para la determinación del miRNA de interés, esquematizado en la **Figura 76**, se basa en tres etapas principales, que consisten en la inmovilización orientada del anticuerpo S9.6 a través de su región Fc sobre la superficie de las ProtG-MBs [Akram, 2004], [Valat, 2000], [Choe, 2016], la captura selectiva de los heterohíbridos DNA–RNA formados previamente en disolución mediante hibridación homogénea a 37 °C y 950 rpm, y el marcaje enzimático de los conjugados DNA–RNA-Ab S9.6-ProtG-MBs, empleando conjugados comerciales de Estrep-HRP. Para el desarrollo de esta metodología se seleccionó como diana el miRNA-205, un supresor tumoral específico de cáncer de mama [Markou, 2014].

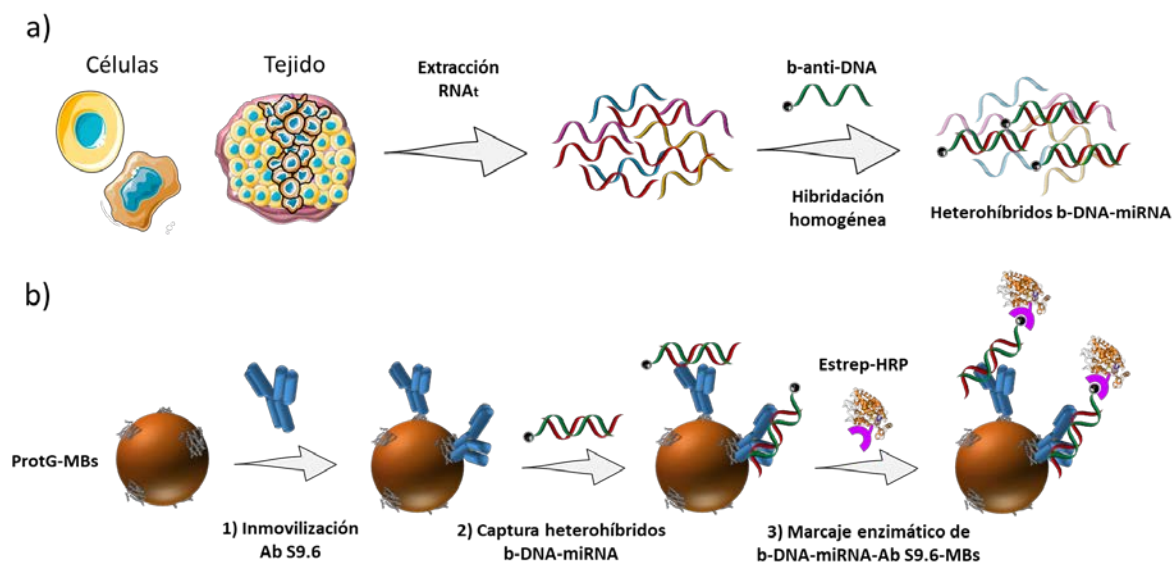


Figura 76: Etapas involucradas en la preparación del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de miRNAs empleando anticuerpos específicos a heterohíbridos DNA-RNA (Ab S9.6) como elementos de captura. Extracción de RNA_t e hibridación homogénea entre el miRNA de interés contenido en la muestra con su sonda de DNA complementaria y modificada con biotina en el extremo 3' (b-anti-DNA) y formación de heterohíbridos b-DNA-miRNA (a). Modificación de las ProtG-MBs con Ab S9.6, captura específica de los heterohíbridos b-DNA-miRNA formados previamente en disolución, y marcaje enzimático de los conjugados b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP para la detección amperométrica de los procesos de afinidad involucrados (b).

La fiabilidad de la metodología propuesta, así como la selectividad del receptor de captura empleado (Ab S9.6) se demostró comparando las señales amperométricas obtenidas tras la incubación de las MBs sin modificar (ProtG-MBs) y modificadas con Ab S9.6 (Ab S9.6-MBs) en ausencia (B) y en presencia (S) de 0.25 nM de miRNA-205 preincubado con sondas biotiniladas sintéticas complementarias de RNA (b-anti-RNA) y DNA (b-anti-DNA).

Los resultados de la **Figura 77** demuestran la elevada especificidad del anticuerpo S9.6 solo para el reconocimiento de heterohíbridos de DNA-miRNA y no de homohíbridos de RNA-miRNA (3 vs. 2), y la ausencia de adsorciones inespecíficas de los heterohíbridos sobre la superficie de las MBs sin modificar (1) o de secuencias de RNA o DNA de cadena sencilla sobre las Ab S9.6-MBs (barras blancas en 2 y 3).

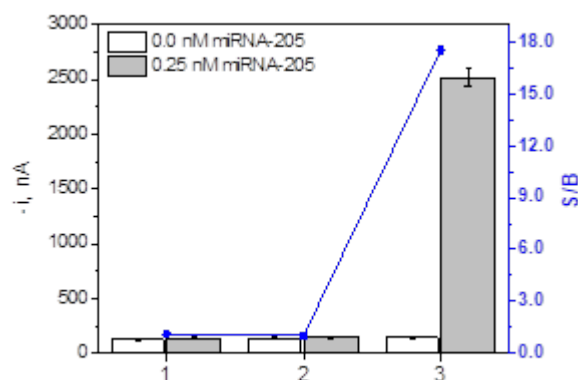


Figura 77: Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas empleando biosensores preparados sobre ProtG-MBs sin modificar (1), y modificadas con Ab S9.6 (Ab S9.6-MBs) (2 y 3) en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras grises, S) de 0.25 nM de miRNA-205 sintético tras su hibridación homogénea con sondas sintéticas complementarias y biotiniladas en el extremo 3' de RNA (2) y DNA (3). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

4.1.2.2.1.1. Optimización de variables experimentales

Una vez confirmada la viabilidad de la metodología se optimizaron las distintas variables que afectaban a su funcionamiento, comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 0.25 nM de miRNA-205 sintético y la correspondiente relación S/B.

Como ejemplo de estos estudios se muestran los resultados experimentales obtenidos en las optimizaciones de las concentraciones de Ab S9.6 inmovilizado sobre la superficie de las ProtG-MBs y de b-anti-DNA empleada durante la etapa de hibridación homogénea, y del número de etapas involucradas en el desarrollo de la metodología.

- Optimización de la concentración de Ab S9.6 y de b-anti-DNA

La influencia de las concentraciones de Ab S9.6 y de b-anti-DNA se evaluó en los rangos comprendidos entre 0.0 y 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.0 y 1.0 μM , respectivamente (**Figura 78**).

Como puede observarse (**Figura 78a**), mientras que las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia del miRNA diana (B) no variaban en todo el intervalo de concentraciones empleado, las obtenidas en su presencia (S) aumentaban significativamente con la concentración de Ab S9.6, lo que provocaba el aumento progresivo de la relación S/B

debido a la captura específica de una mayor cantidad de heterohíbridos de b-DNA-miRNA por las Ab S9.6-MBs. Aunque la mayor relación S/B se obtuvo para la mayor concentración de Ab S9.6 ensayada ($5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$), como compromiso entre sensibilidad y coste por ensayo, se seleccionó $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ como concentración óptima para estudios posteriores.

En cuanto a los resultados obtenidos en función de la concentración de b-anti-DNA empleada para la formación de los heterohíbridos DNA-miRNA (**Figura 78b**), aunque las respuestas inespecíficas tampoco variaban significativamente en todo el intervalo estudiado, las respuestas específicas aumentaban con la concentración de b-anti-DNA hasta $0.05 \mu\text{M}$ (concentración seleccionada como óptima) y disminuía para concentraciones superiores debido a la disminución en la eficiencia de hibridación cuando se emplean elevadas concentraciones de b-anti-DNA [Liu, 2014^b], [Zouari, 2018^a]. Los resultados obtenidos en ausencia de b-anti-DNA confirmaron la mínima adsorción inespecífica del conjugado Estrep-HRP sobre las Ab S9.6-MBs.

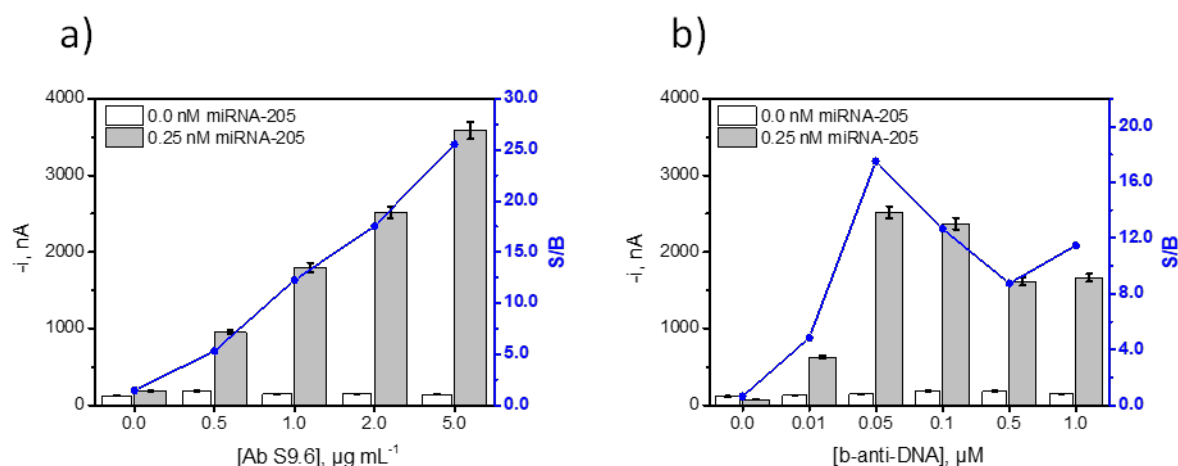


Figura 78: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras grises, S) de 0.25 nM de miRNA-205 sintético en función de las concentraciones de Ab S9.6 inmovilizado sobre las MBs (a) y de b-anti-DNA empleada durante la etapa de hibridación homogénea (b). $E_{app} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

- Evaluación del número de etapas

La influencia de las etapas involucradas en la fabricación de los biosensores desarrollados se estudió comparando las respuestas amperométricas obtenidas modificando las MBs siguiendo los protocolos detallados en la **Tabla 26**.

Tabla 26: Descripción de los protocolos evaluados para la optimización de las etapas empleadas en la fabricación de los biosensores desarrollados.

Protocolo	Descripción de las etapas involucradas
1	1) Inmovilización de Ab S9.6 sobre la superficie de las ProtG-MBs → Ab S9.6-MBs 2) Hibridación homogénea entre b-anti-DNA y miRNA → heterohíbrido b-DNA-miRNA 3) Captura específica de heterohíbridos de b-DNA-miRNA por las ProtG-MBs 4) Marcaje enzimático de b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP
2	1) Hibridación homogénea entre b-anti-DNA y miRNA → heterohíbrido b-DNA-miRNA 2) Captura específica de heterohíbridos de b-DNA-miRNA por parte de Ab S9.6 en disolución → b-DNA-miRNA-Ab S9.6 3) Inmovilización del conjunto b-DNA-miRNA-Ab S9.6 sobre ProtG-MBs 4) Marcaje enzimático de b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP
3	1) Hibridación homogénea entre b-anti-DNA y miRNA y captura específica del heterohíbrido b-DNA-miRNA por parte de Ab S9.6 en disolución → b-DNA-miRNA-Ab S9.6 2) Inmovilización del conjunto b-DNA-miRNA-Ab S9.6 sobre ProtG-MBs 3) Marcaje enzimático de b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP
4	1) Inmovilización de Ab S9.6 sobre la superficie de las ProtG-MBs → Ab S9.6-MBs 2) Hibridación homogénea entre b-anti-DNA y miRNA → heterohíbrido b-DNA-miRNA 3) Marcaje enzimático de los heterohíbridos b-DNA-miRNA con Estrep-HRP en disolución → HRP-Estrep-b-DNA-miRNA 4) Captura específica de HRP-Estrep-b-DNA-miRNA sobre Ab S9.6-MBs

Aunque los resultados obtenidos (**Figura 79**) demostraron que era posible discriminar la presencia del miRNA diana empleando cualquiera de los protocolos evaluados, el *protocolo 1* basado en la inmovilización del Ab S9.6 sobre la superficie de las MBs, la captura específica de los heterohíbridos b-DNA-miRNA correspondientes y el marcaje enzimático de los conjugados b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP, proporcionó la mayor relación S/B, por lo que se seleccionó como óptimo para la implementación de la estrategia biosensora desarrollada.

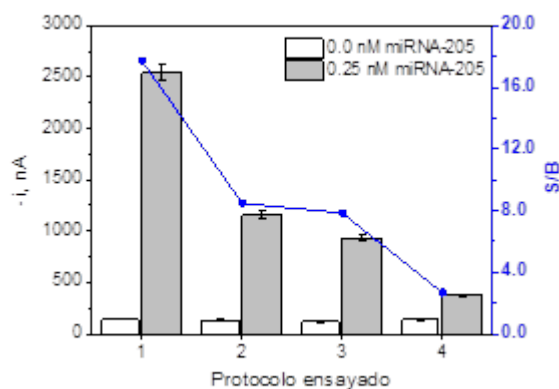


Figura 79: Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras grises, S) de 0.25 nM de miRNA-205 sintético en función de las etapas involucradas para la preparación de los biosensores. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

La comparación entre los resultados obtenidos para los cuatro protocolos evaluados, demuestran la peor inmovilización del Ab S9.6 sobre las ProtG-MBs previa captura de los heterohíbridos de b-DNA-miRNAs (*Protocolos 2 y 3*) y de los b-DNA-miRNA previamente marcados con Estrep-HRP sobre las Ab S9.6-MBs (*Protocolo 4*), debido principalmente a factores estéricos.

El resto de las variables experimentales optimizadas, los rangos evaluados para cada una de ellas y los valores seleccionados como óptimos se resumen en la **Tabla 27**.

Tabla 27: Optimización de las variables experimentales que afectan al funcionamiento del biosensor desarrollado para la determinación de miRNAs basado en el empleo de Ab S9.6 como bio-receptor de captura.

<i>Variable estudiada</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>ProtG-MBs, μL</i>	<i>2.5–10.0</i>	<i>2.5</i>
<i>[Ab S9.6], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.0–5.0</i>	<i>2.0</i>
<i>[b-anti-DNA], μM</i>	<i>0.0–1.0</i>	<i>0.05</i>
<i>Dilución Estrep-HRP</i>	<i>1:25000–1:2500</i>	<i>1:25000</i>
<i>$t_{\text{incubación Ab S9.6}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>45</i>
<i>$t_{\text{hibridación b-DNA-miRNA}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>45</i>
<i>$t_{\text{Ab S9.6-MBs + b-DNA-miRNA}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>45</i>
<i>$t_{\text{incubación Estrep-HRP}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>30</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>3–4</i>	<i>4</i>
<i>Temperatura de ensayo, $^{\circ}\text{C}$</i>	<i>25–37</i>	<i>37</i>

4.1.2.2.1.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas, se caracterizó el comportamiento analítico del biosensor desarrollado para la determinación de concentraciones crecientes de miRNA-205 sintético.

Como puede observarse en la **Figura 80**, la variación de las señales amperométricas demostró presentar una dependencia lineal ($r = 0.998$) con la concentración del miRNA sintético en el rango de concentraciones comprendido entre 8.15 y 250 pM, con una ordenada en el origen de (172.8 ± 26.7) nA y una pendiente de (9548 ± 211) nA nM⁻¹. Esta metodología, que combina de forma ingeniosa la eficiencia de dos procesos de afinidad (inmunoreconocimiento e hibridación), demostró una sensibilidad 29 veces superior ($(9548 \text{ vs. } 334)$ nA nM⁻¹) y un LD, estimado según el criterio $3 \times s_b/m$, 17 veces inferior (2.4 vs. 40 pM) a la estrategia desarrollada previamente y basada en el empleo de la proteína p19 como bio-receptor de captura (Apdo. 4.1.2.1.1) [Campuzano, 2014^b], lo que permite la detección sensible del supresor tumoral seleccionado empleando protocolos sencillos de preparación y detección electroquímica, y que demuestran elevada reproducibilidad (RSD = 3.1 %) entre las

respuestas amperométricas obtenidas para una concentración 0.075 nM de miRNA-205 sintético con 8 biosensores diferentes preparados de la misma manera.

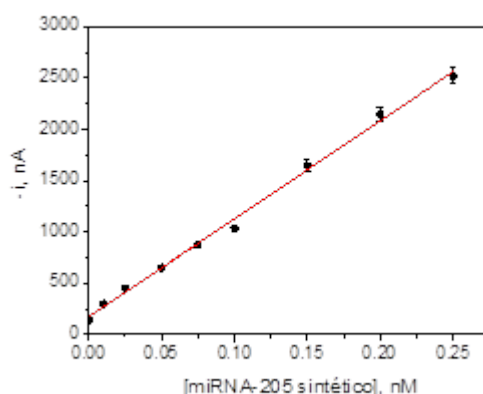


Figura 80: Curva de calibrado obtenida con el biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-205 sintético. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Además, la evaluación de la estabilidad con el tiempo de las Ab S9.6-MBs (resultados no mostrados), preparadas y almacenadas a 4 °C en PBS filtrado, demostraron que las respuestas amperométricas obtenidas para una concentración 0.075 nM de miRNA-205 sintético se encontraban dentro de los límites de control superior e inferior (establecidos a $\pm 3s$ del valor medio de la intensidad de corriente medida con 5 biosensores preparados el primer día de estudio y modificación de las MBs, siendo s el valor de la desviación estándar) durante al menos 29 días. Estos resultados confirman la elevada estabilidad del enlace formado entre las proteínas bacterianas y algunas inmunoglobulinas de mamíferos a través de su región Fc [Akram, 2004], [Valat, 2000], [Choe, 2016].

Es importante destacar que el LD obtenido, aunque suficiente para la determinación del contenido endógeno de miRNA-205 en distintas muestras clínicas, era superior a los reportados por Tran y col. y Wang y col., con valores comprendidos entre 0.4–10 fM para la detección de miRNA-29b-1 y miRNA-141 [Tran, 2013], [Tran, 2014], y miRNA-319-a [Wang, 2015^b], respectivamente, lo que puede atribuirse al empleo del Ab S9.6 como bio-receptor de detección en vez de captura.

Considerando la longitud media que presentan los heterohíbridos con extremos romos formados tras la hibridación de sondas de DNA complementarias y el miRNA diana (19–22 bp), y que el epítipo del Ab S9.6 reconoce de manera eficiente y específica una región

de aproximadamente 6 bp de estos heterohíbridos, a cada heterohíbrido podrían enlazarse hasta 3 unidades de Ab S9.6 [Qavi, 2010], lo que explicaría la sensibilidad superior de las estrategias que emplean el anticuerpo como bio-receptor de detección.

Sin embargo, es importante resaltar que, a pesar de la elevada sensibilidad que ofrecen, ninguno de los trabajos descritos anteriormente se aplicó a la determinación de miRNAs en muestras reales; además, requieren procesos de preparación bastante complejos y largos (12 y 13 h), en comparación con la sencillez y rapidez que caracteriza al biosensor desarrollado en este trabajo en el que se requiere un tiempo de tan solo 2 h. Resulta destacable también que en caso necesario, y cuando la sensibilidad no sea un factor determinante, el tiempo de preparación puede reducirse a tan solo 25 minutos, disminuyendo los tiempos de incubación en las etapas de hibridación homogénea entre b-anti-DNA y el miRNA diana, captura específica de los heterohíbridos b-DNA-miRNA formados por las Ab S9.6-MBs, y marcaje enzimático del conjunto b-DNA-RNA-Ab S9.6-MBs con Estrep-HRP a 15, 5 y 5 minutos, respectivamente. Esta reducción del tiempo de ensayo de 2 h a 25 minutos supone una pérdida de sensibilidad del 40 % ((9548 vs. 5791) nA nM⁻¹).

Otro aspecto de la estrategia desarrollada que resulta especialmente relevante, puesto que no se ha evaluado previamente con otras plataformas biosensoras, es la capacidad de aislamiento y posterior liberación, en presencia de un exceso de heterohíbridos de DNA-RNA no biotinilados, de los heterohíbridos capturados por las Ab S9.6-MBs.

Para llevar a cabo este estudio, las Ab S9.6-MBs se incubaron con heterohíbridos b-DNA-miRNA preparados para concentraciones crecientes de miRNA-205 y, tras la monitorización de la señal amperométrica para cada concentración del miRNA diana ensayada, las HRP-Estrep-b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs se incubaron durante 2 horas a 25 °C y 950 rpm, con disoluciones que contenían un gran exceso (500 nM) de heterohíbridos de DNA-RNA no biotinilados para realizar una nueva determinación del miRNA diana por incubación en disoluciones que contenían heterohíbridos b-DNA-miRNA.

Los resultados experimentales obtenidos, que se muestran en la **Figura 81**, confirmaron la excelente capacidad de las Ab S9.6-MBs para aislar y posteriormente liberar de manera efectiva los heterohíbridos previamente capturados, observándose un aumento progresivo en la respuesta proporcionada por los biosensores preparados a partir de ellas para concentraciones crecientes de miRNA-205 comprendidas entre 0.05 y 0.25 nM, y

demonstraron la reducción drástica de la respuesta amperométrica al nivel obtenido en ausencia del miRNA diana tras la incubación de los conjugados HRP-Estrep-b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs con un exceso de DNA-miRNA no biotinilado, lo que confirma el desplazamiento eficiente de los heterohíbridos marcados (HRP-Estrep-b-DNA-miRNA) de las Ab S9.6-MBs, y por lo tanto, su posible reutilización para realizar nuevas determinaciones.

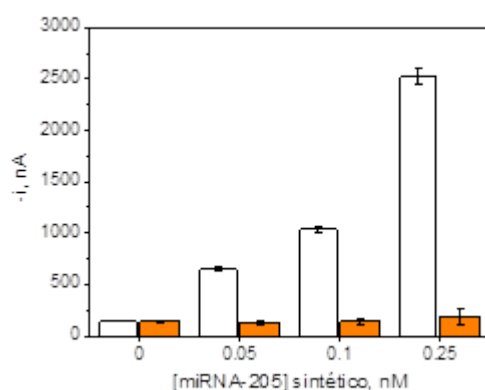


Figura 81: Demostración de la fiabilidad de la metodología desarrollada para la reutilización de las Ab S9.6-MBs en distintas determinaciones. Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en presencia de concentraciones crecientes de miRNA-205 sintético antes (barras blancas) y después (barras naranjas) de la incubación de las HRP-Estrep-b-DNA-miRNA-Ab S9.6-MBs durante 2 horas (25 °C, 950 rpm) con disoluciones que contenían un exceso (500 nM) de heterohíbridos DNA-RNA no biotinilados. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.1.2.2.1.3. Evaluación de la selectividad de la metodología

La selectividad de esta estrategia se evaluó frente a secuencias sintéticas de miRNA-205 con una base desapareada en posición central (1-m), y secuencias no complementarias (NC) de otros miRNAs con papel oncogénico relevante: miRNA-21 (NC₁) y miRNA-192 (NC₂), mediante la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores preparados en ausencia y en presencia de 0.25 nM de cada una de estas secuencias sintéticas.

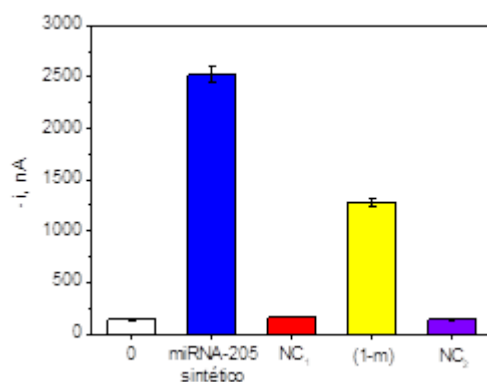


Figura 82: Caracterización de la selectividad del biosensor desarrollado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 0.25 nM de miRNA-205, miRNA-21 (NC₁), miRNA-205 con una base desapareada en posición central (1-m) y miRNA-192 (NC₂) sintéticos. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados de la **Figura 82** permiten concluir que el biosensor desarrollado ofrece una discriminación total hacia las secuencias NC, y del 51 % frente a secuencias 1-m. La mejor selectividad obtenida frente a secuencias 1-m empleando como bio-receptor de captura el Ab S9.6 en vez de la p19 (discriminación del 51 % vs. 83 %) puede atribuirse tanto a la diferente afinidad de ambos bio-receptores por sus correspondientes híbridos de RNA, como al mecanismo por el que la p19 reconoce y captura a los homohíbridos de RNA, a través de interacciones que tienen lugar entre los aminoácidos terminales de la proteína y los grupos fosfato de los extremos del homohíbrido, lo que posiblemente dificulta la discriminación adecuada de híbridos formados por secuencias de miRNAs que se diferencian únicamente en una base desapareada en posición central de la secuencia [Danielson, 2013].

4.1.2.2.1.4. Aplicación al análisis de RNA_t extraído de células y tejidos

Puesto que el Ab S9.6 reconoce de manera específica heterohíbridos de DNA–RNA independientemente de su secuencia de bases, la metodología desarrollada se aplicó a la determinación individual de dos de los miRNAs de mayor relevancia en cáncer: el oncogén no específico miRNA-21 y el supresor tumoral específico de cáncer de mama miRNA-205, en muestras de RNA_t extraídas de líneas celulares de cáncer de mama, colon y páncreas, y de tejidos de mama frescos y embebidos en bloques de parafina correspondientes a pacientes

clasificadas en distintos subtipos moleculares de cáncer de mama de acuerdo con las técnicas convencionales.

La **Figura 83** muestra los resultados obtenidos para la determinación individual de miRNA-21 y miRNA-205 en 500 ng de RNA_t extraído de células epiteliales no tumorigénicas (MCF-10A), células de cáncer de mama (MCF-7 y SK-BR-3), colon (SW480 y SW620), y páncreas (BxPC3), y en 1.0 µg de extractos de RNA_t de tejidos frescos de mama tumorales (T) y sus pareados correspondientes no tumorales (NT).

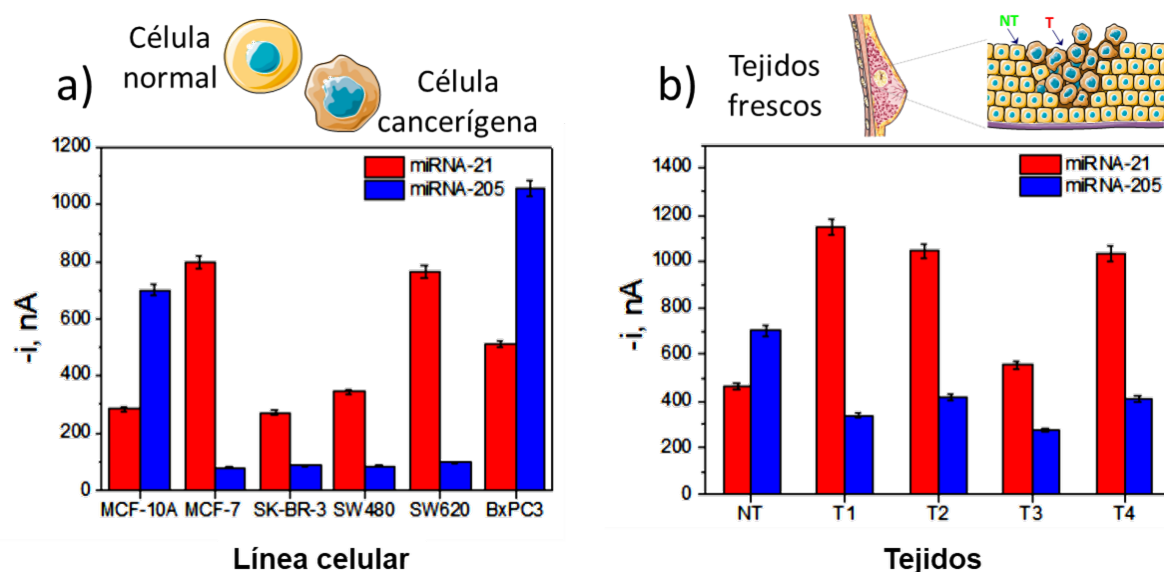


Figura 83: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para la determinación individual de miRNAs maduros en 500 ng de RNA_t extraído de líneas celulares (a) y en 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos de mama frescos tumorales (T) y no tumorales (NT) (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

Los resultados obtenidos en los extractos de líneas celulares (**Figura 83a**) ponen de manifiesto la clara hiperexpresión del oncogén (miRNA-21) y la expresión reducida del supresor tumoral (miRNA-205) en células de cáncer de mama (MCF-7 y SK-BR-3) y colon (SW480 y SW620), en comparación con los niveles de expresión observados en células epiteliales normales MCF-10A [Campuzano, 2014^b], [Elgamal, 2013], [Li, 2016^b]. El nivel de expresión de miRNA-205, superior al de miRNA-21, encontrado en las células de cáncer de páncreas (BxPC3) estaba de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por otros autores en esta línea celular [Zhang, 2009].

Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis de las muestras tisulares (**Figura 83b**) también confirmaron, como era de esperar, la hiperexpresión del oncogén miRNA-21 y la expresión reducida del supresor tumoral miRNA-205 en las cuatro muestras T ensayadas, en comparación con los niveles de expresión observados en las muestras NT, obteniéndose unas relaciones de expresión T/NT para el oncogén comprendidas entre 1.2 y 2.5, en buena concordancia con el rango encontrado por otros autores para este mismo miRNA en pacientes con cáncer de mama (T/NT comprendidas entre 1.6 y 2.5) [Savad, 2012]. Es importante mencionar que, puesto que las respuestas amperométricas obtenidas para cada miRNA en las muestras pareadas de tejidos NT ensayadas no fueron significativamente distintas, por simplicidad solo se han incluido en la **Figura 83b** los resultados de cada miRNA en una muestra NT representativa.

Con objeto de demostrar la fiabilidad de los resultados que proporcionan los biosensores preparados, y teniendo en cuenta la ausencia de efecto matriz empleando cantidades iguales o inferiores a 1.0 μg de muestras de RNA_t, se determinó el contenido endógeno de miRNA-21 en todas ellas mediante interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra en la curva de calibrado construida para estándares de miRNA-21 sintético (no mostrada). Los resultados obtenidos con el biosensor desarrollado (resumidos en la **Tabla 28**) estaban de acuerdo con los contenidos estimados por otros autores con métodos de análisis de referencia, tanto en células MCF-7 [Chan, 2010], [Degliangeli, 2014], como en tejidos frescos [Xu, 2016].

Tabla 28: Contenidos endógenos de miRNA-21 determinados en extractos de RNA_t de líneas celulares y tejidos tumorales (T) y no tumorales (NT) frescos de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama con el biosensor desarrollado y descritos por otros autores.

<i>[miRNA-21], amol ng⁻¹ RNA_t (n=3)</i>		
<i>Tipo de muestra</i>	<i>Biosensor desarrollado</i>	<i>Resultados descritos por otros autores</i>
Líneas celulares	MCF-10A	0.93 [Xu, 2016]
	MCF-7	(0.92–1.2) [Chan, 2010], [Degliangeli, 2014] 3.3 [Xu, 2016]
Tejidos frescos de mama	NT1	(1.5 ± 0.1)
	T1	(3.9 ± 0.3)
	NT2	(1.4 ± 0.1)
	T2	(2.4 ± 0.3)
	NT3	(1.3 ± 0.1)
	T3	(1.6 ± 0.1)
	NT4	(1.4 ± 0.1)
	T4	(3.4 ± 0.2)

Por otro lado, y con el objeto de reducir la cantidad de muestra requerida para la determinación de miRNA-21 en extractos de RNA_t de células y tejidos, se evaluó la dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en función de la cantidad de RNA_t extraído de células MCF-7 (**Figura 84a**) y de tejido T fresco de mama (**Figura 84b**). Como puede observarse, se obtuvieron intensidades de corriente catódica significativamente diferentes a la registrada en ausencia de RNA_t con tan solo 50 y 100 ng de RNA_t extraído de células MCF-7 y tejidos T de cáncer de mama.

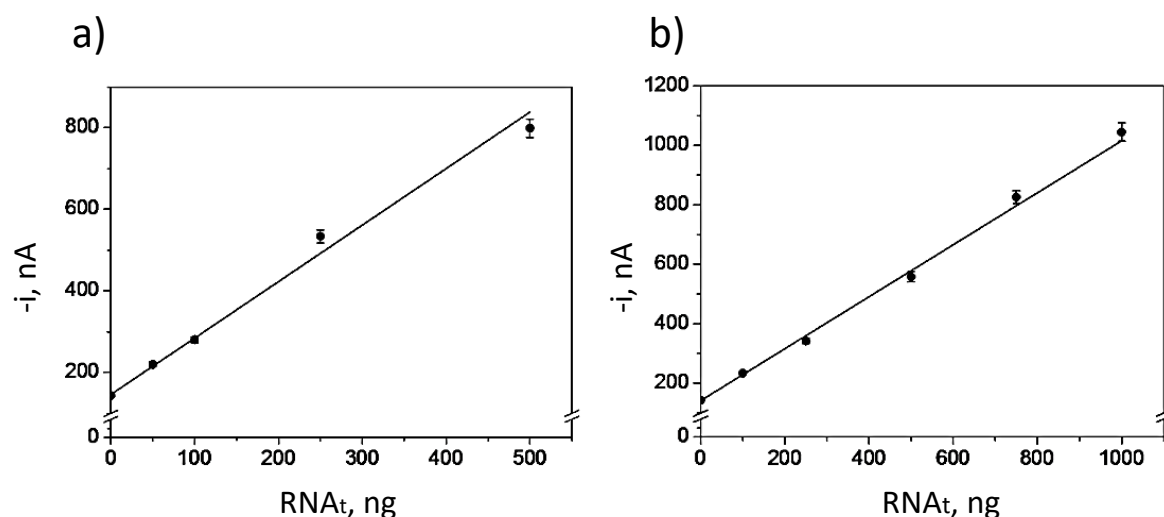


Figura 84: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21 con la cantidad de RNA_t extraído de células MCF-7 (a) y de tejidos T de mama (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Además, la versatilidad que ofrece la metodología desarrollada para la detección sensible de cualquier miRNA, simplemente variando la secuencia b-anti-DNA complementaria al miRNA de interés, se demostró mediante la obtención del perfil de expresión de tres miRNAs con carácter oncogénico (miRNA-21, miRNA-223 y miRNA-155) y del supresor tumoral específico miRNA-205, en tejidos T y NT pareados de mama.

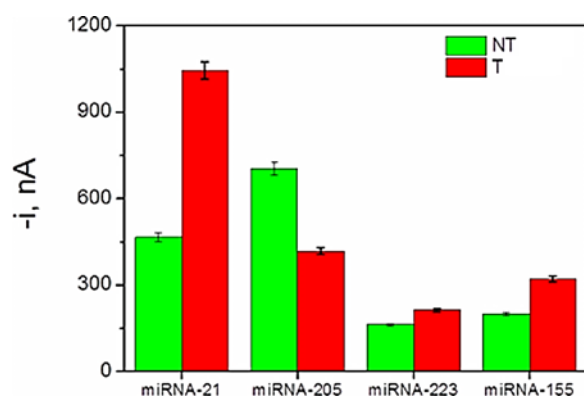


Figura 85: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para la detección individual de miRNA-21, miRNA-205, miRNA-223 y miRNA-155 en $1.0 \mu\text{g}$ de RNA_t extraído de tejidos frescos T y NT de mama. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Tal y como muestran los resultados de la **Figura 85**, los miRNAs con función oncogénica (miRNA-21, miRNA-223 y miRNA-155) exhibieron una clara hiperexpresión en tejidos T, mientras que el supresor tumoral (miRNA-205) mostró una expresión reducida en este tipo de muestras, en comparación con los niveles de expresión observados para cada miRNA en los tejidos NT pareados correspondientes, confirmando el rol que desempeña cada miRNA [Badr, 2016], [Pinatel, 2014], [Liu, 2015], [Asghari, 2018] y demostrando la robustez, el carácter universal y la versatilidad de las plataformas electroquímicas desarrolladas, con aplicabilidad para la detección fiable de paneles de miRNAs.

Con el objetivo de extender la aplicabilidad práctica del biosensor desarrollado, y considerando la relevancia de poder realizar la determinación en muestras embebidas en parafina, se evaluó la expresión de miRNA-21 y miRNA-205 en 1.0 µg de RNA_t extraído de 15 muestras de tejidos (T) y pareados adyacentes (NT), fijados en formalina y embebidos en parafina, de pacientes clasificadas mediante técnicas convencionales (IHC e hibridación *in situ* cromogénica con plata (SISH)), en 3 subtipos moleculares: subgrupo HER2-, con expresión negativa para los receptores ER, PR y HER-2, subgrupo catalogado como *Equívoco*, con expresión positiva para los receptores hormonales ER y PR y expresión equívoca para HER-2, y subgrupo HER2+, con expresión variable para los receptores hormonales ER y PR y expresión positiva para HER-2 (**Figura 86**).

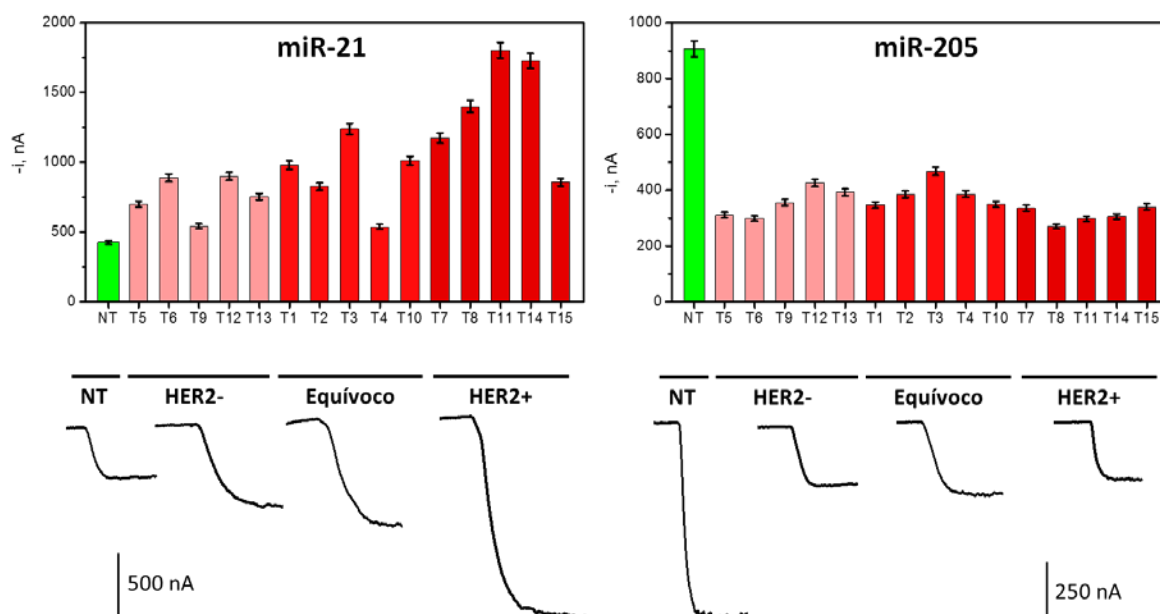


Figura 86: Determinación individual de miRNA-21 y miRNA-205 en 1.0 μg de RNA_t extraído de tejidos T y NT de mama embebidos en bloques de parafina, agrupados de acuerdo con su clasificación previa en función del receptor HER-2. $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestran también ejemplos representativos de los amperogramas obtenidos en cada uno de los grupos analizados para la determinación de ambos miRNAs.

Las respuestas amperométricas obtenidas para cada miRNA ponen nuevamente de manifiesto el comportamiento de oncogén del miRNA-21 y supresor tumoral del miRNA-205 en cáncer de mama.

La comparación de las pendientes de las curvas de calibrado construidas para estándares de miRNA-21 sintético preparados en disolución reguladora de PBS (9548 ± 211) nA nM^{-1} y en presencia de 1.0 μg de RNA_t extraído de tejidos T ($(10256 \pm 606) \text{ nA nM}^{-1}$) y NT ($(9070 \pm 504) \text{ nA nM}^{-1}$) embebidos en parafina, confirmaron la ausencia de efecto matriz también en este tipo de muestras, por lo que es posible determinar el contenido endógeno de ambos miRNAs en estas muestras por simple interpolación en el calibrado obtenido para los miRNAs sintéticos.

Los valores medios de concentración determinados para ambos miRNAs, que se muestran en la **Figura 87**, demostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de miRNA-21 en las muestras clasificadas como HER2+, con respecto a su expresión en las muestras HER2-, lo que está de acuerdo con los resultados encontrados por otros autores [Eto, 2014], [Gong, 2011], y una expresión reducida del supresor tumoral miRNA-205 en el

subgrupo clasificado como HER2+, en comparación con la observada en el subgrupo HER2-, lo que también concuerda con el papel que caracteriza a cada uno de los miRNAs analizados en este tipo de neoplasia.

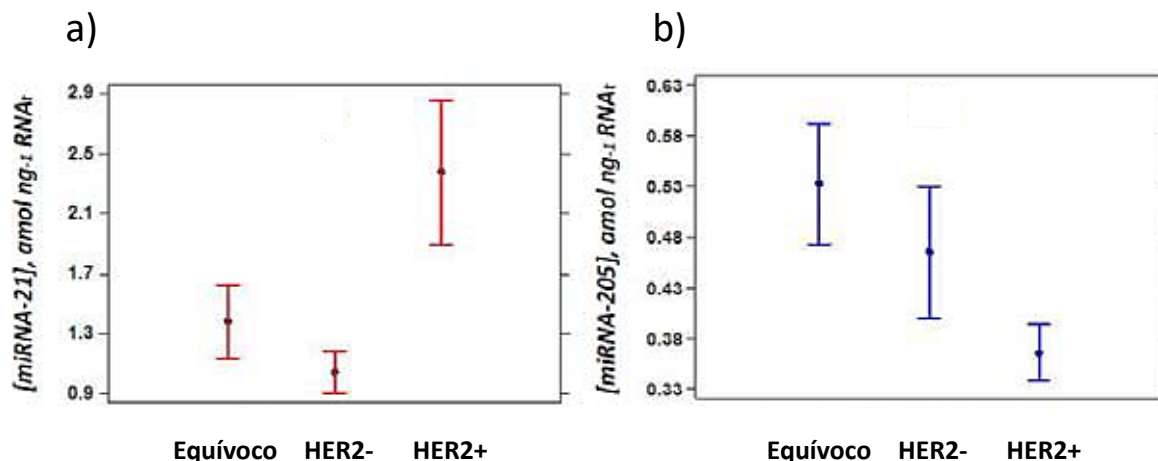


Figura 87: Valores medios del contenido endógeno de miRNA-21 (a) y miRNA-205 (b), expresados en amol ng⁻¹ RNA_t, obtenidos con el biosensor desarrollado para 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos T embebidos en parafina de pacientes con cáncer de mama diagnosticadas con distintos subtipos moleculares de HER2.

Asimismo, es importante señalar que, tanto el contenido endógeno determinado para cada biomarcador en las muestras parafinadas seleccionadas como sus relaciones de expresión, definidas como T/NT para miRNA-21 y NT/T para miRNA-205, coinciden con los resultados reportados en otros trabajos de investigación en los que se emplearon técnicas de análisis completamente distintas, como espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS), en muestras de tejidos frescos de mama [Xu, 2016], lo que demuestra la extraordinaria robustez de la herramienta biosensora propuesta para realizar, con la misma sensibilidad, el análisis de los perfiles de expresión de miRNAs maduros en muestras de tejidos frescos o conservados en parafina.

Por último, atendiendo a la limitada cantidad y disponibilidad de las muestras de RNA_t necesarias para la realización de los análisis pertinentes, se evaluó la posibilidad de determinar, de manera secuencial, miRNA-21 y miRNA-205 empleando el mismo extracto de RNA_t. Para llevar a cabo este estudio, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas tras la detección individual de miRNA-21 y miRNA-205 empleando 1.0 µg de RNA_t extraído de tejido tumoral (T) de mama embebido en parafina para el análisis de cada diana, y empleando el mismo extracto de RNA_t para la detección individual y secuencial de cada

miRNA, obteniéndose, tal y como demuestra la **Figura 88**, respuestas amperométricas similares cuando se emplea el mismo extracto o extractos diferentes para la determinación de ambos miRNAs. Estas observaciones constituyen una importante ventaja desde el punto de vista práctico en situaciones en las que la cantidad de RNA_t extraído sea limitada y no resulte suficiente para el análisis de dos o más miRNAs, ya que demuestran la posibilidad de reutilizar el mismo extracto para la detección de distintos miRNAs mediante la suplementación secuencial del mismo con la secuencia biotinilada de DNA complementaria al miRNA objetivo que pretenda analizarse.

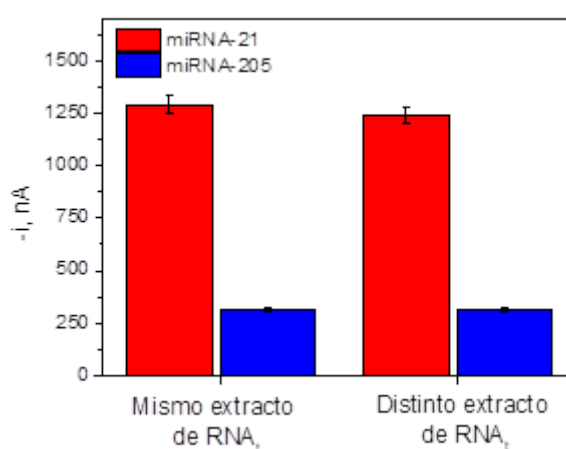


Figura 88: Evaluación de la reutilización de extractos de RNA_t mediante el biosensor desarrollado. Respuestas amperométricas obtenidas para la detección individual y secuencial de miRNA-21 y miRNA-205 en 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos tumorales (T) de mama embebidos en parafina empleando el mismo y distintos extractos de muestra para cada determinación. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

Los biosensores desarrollados han demostrado poseer excelentes características analíticas para la determinación de cualquier miRNA sintético diana (LD~2.4 pM) y presentan utilidad clínica para la monitorización fiable, sensible y selectiva de miRNAs maduros en una amplia variedad de especímenes clínicos de elevada complejidad: extractos crudos de RNA_t de células cancerígenas modelo de distintas neoplasias (mama, colon y páncreas), y de tejidos frescos y conservados en parafina de pacientes clasificadas con subtipos moleculares de la misma neoplasia. Los hallazgos pioneros obtenidos destacan el potencial de las bioplataformas desarrolladas para proporcionar, a través de la determinación de estos dos miRNAs, datos complementarios a los que aportan las técnicas clínicas convencionales para la identificación de subtipos HER2, en solo 2 horas.

4.1.2.2.2. BIOSENSOR PARA microRNAs EMPLEANDO ANTICUERPOS SELECTIVOS COMO ELEMENTOS DE DETECCIÓN

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el artículo *Vargas et al. Magnetic beads-based sensor with tailored sensitivity for rapid and single-step amperometric determination of miRNAs. International Journal of Molecular Sciences 18 (2017) 2151; DOI:10.3390/ijms18112151*, adjuntado como anexo al final de esta Tesis Doctoral. Es importante resaltar que **este trabajo ha sido seleccionado uno de los tres mejores artículos de investigación publicado durante el 2018 en la revista International Journal of Molecular Science.**

Teniendo en cuenta el excelente funcionamiento del biosensor presentado en el apartado anterior y la versatilidad que caracteriza al anticuerpo específico S9.6, se ha desarrollado una estrategia biosensora que combina el empleo de Estrep-MBs, secuencias de DNA complementarias al miRNA objetivo y biotiniladas en el extremo 3' (b-anti-DNA), Ab S9.6 como elementos de detección, y la proteína bacteriana A (ProtA) conjugada a un homopolímero que contiene 40 unidades de la enzima HRP (ProtA-poli-HRP40), para la determinación de miRNAs empleando SPCEs como transductores electroquímicos.

La metodología propuesta, esquematizada en la **Figura 89**, consiste en la captura eficiente del miRNA de interés sobre Estrep-MBs previamente modificadas con b-anti-DNA, y el reconocimiento y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA correspondientes formados por hibridación en la superficie de las MBs, por los anticuerpos S9.6 conjugados previamente a ProtA-poli-HRP40 a través de su región Fc. Para el desarrollo de esta metodología se seleccionó como miRNA diana el oncogén miRNA-21.

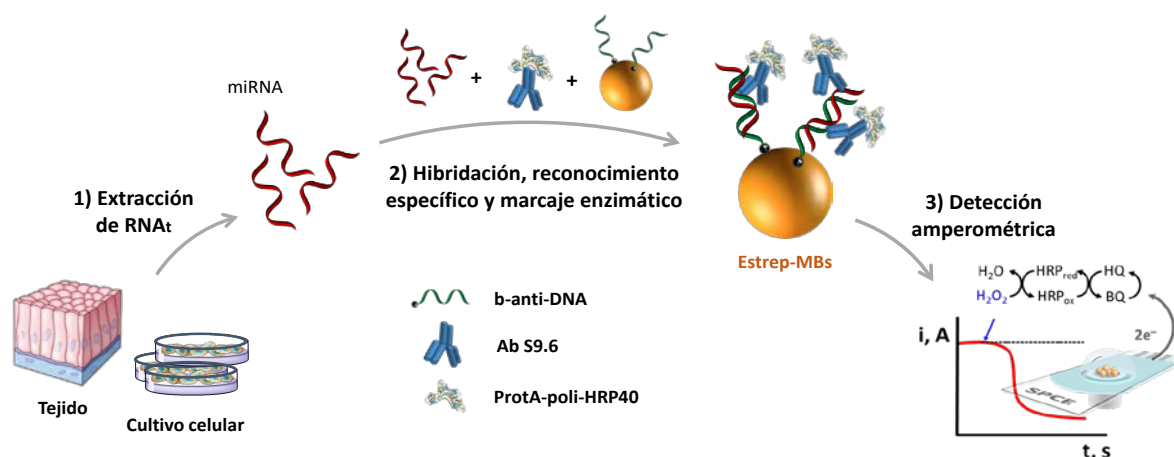


Figura 89: Etapas involucradas en la preparación del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de miRNAs basado en el empleo de Estrep-MBs modificadas con b-anti-DNA, Ab S9.6 como bio-receptor de detección y la ProtA-poli-HRP40 como marcador enzimático. Detalle de las etapas de extracción de RNA_t (1), captura, reconocimiento y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA (2) y detección amperométrica del miRNA objetivo (3).

4.1.2.2.1. Optimización de variables experimentales

Como en las estrategias biosensoras presentadas anteriormente, la optimización de las variables experimentales que aseguraban el mejor funcionamiento de la metodología propuesta se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 100 pM de miRNA-21 sintético y la relación S/B resultante.

Como ejemplos de estas optimizaciones se presentan los resultados obtenidos en los estudios del número de etapas involucradas en el desarrollo de la metodología (**Figura 90**) y de los tiempos de pre-incubación entre Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 y de la etapa de hibridación, reconocimiento específico y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA (**Figura 91**).

- Evaluación del número de etapas

Para optimizar el número de etapas implicadas en la modificación de las MBs se compararon los protocolos experimentales que se detallan a continuación, todos ellos consistentes en etapas secuenciales de incubación de 30 minutos cada una:

- **Protocolo en 4 etapas:** 1) inmovilización de b-anti-DNA sobre Estrep-MBs; 2) hibridación eficiente de miRNA-21 sobre b-anti-DNA-Estrep-MBs; 3) reconocimiento

de los heterohíbridos DNA-miRNA por anticuerpos S9.6 y 4) marcaje enzimático de Ab S9.6-DNA-miRNA-Estrep-MBs con ProtA-poli-HRP40.

- **Protocolo en 3 etapas:** 1) inmovilización de b-anti-DNA sobre Estrep-MBs; 2) hibridación eficiente de miRNA-21 sobre b-anti-DNA-Estrep-MBs y 3) reconocimiento de los heterohíbridos DNA-miRNA con anticuerpos S9.6 previamente marcados con ProtA-poli-HRP40.
- **Protocolo en 2 etapas:** 1) inmovilización de b-anti-DNA sobre Estrep-MBs y 2) hibridación eficiente de miRNA-21 sobre b-anti-DNA-Estrep-MBs y reconocimiento de los heterohíbridos DNA-miRNA con anticuerpos S9.6 previamente marcados con ProtA-poli-HRP40.

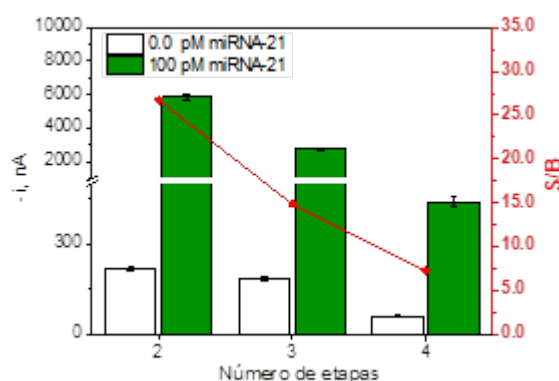


Figura 90: Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras verdes, S) de 100 pM de miRNA-21 sintético en función de los protocolos experimentales ensayados para la modificación de las MBs. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Los resultados mostrados en la **Figura 90** indicaron que los procesos de reconocimiento y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA formados sobre la superficie de las Estrep-MBs resultaban más eficientes cuando el conjunto Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 se encontraba libre en disolución (protocolos basados en 2 y 3 etapas), y que el protocolo en el que se realizaban simultáneamente los procesos de hibridación del miRNA-21 sobre las b-anti-DNA-Estrep-MBs y de reconocimiento y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA formados (protocolo basado en 2 etapas) proporcionaba la mayor relación S/B. Cabe destacar además que este protocolo en 2 etapas, seleccionado

como óptimo para la fabricación de los biosensores, además de proporcionar la mejor sensibilidad permitía realizar la determinación en el menor tiempo de ensayo.

- Optimización del tiempo de pre-incubación de la mezcla Ab S9.6 + ProtA-poli-HRP40 y tiempo de incubación de miRNA-21 + Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 sobre las b-anti-DNA-MBs

Una vez seleccionado el protocolo óptimo para la modificación de las MBs base de los biosensores propuestos, se evaluó la influencia del tiempo de incubación en las dos etapas que implican: 1) pre-incubación de la mezcla conteniendo las concentraciones óptimas de Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 (**Figura 91a**) y 2) incubación de la mezcla miRNA-21 + Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 sobre b-anti-DNA-MBs (**Figura 91b**).

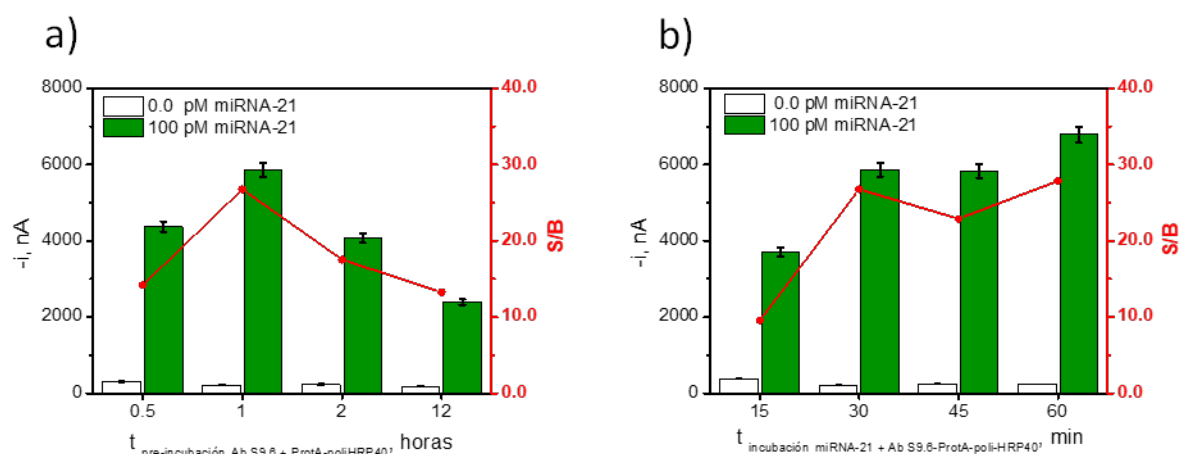


Figura 91: Respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras verdes, S) de 100 pM de miRNA-21 sintético en función del tiempo de pre-incubación de la mezcla Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 (a) y del tiempo de incubación de la mezcla miRNA-21 + Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 sobre las b-anti-DNA-MBs (b). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Como puede observarse en la **Figura 91a**, la mejor relación S/B se obtenía empleando tiempos de pre-incubación de Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 de 1 hora. La relación S/B disminuía significativamente empleando tiempos superiores, debido posiblemente a procesos de aglutinamiento que dificultan el reconocimiento de Ab S9.6 por la ProtA-poli-HRP40.

En cuanto a la etapa que involucra la formación de los heterohíbridos de DNA-miRNA sobre las MBs y su marcaje enzimático con Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40, los resultados

mostrados en la **Figura 91b** confirmaron que un tiempo de incubación de 30 minutos era suficiente para asegurar que estos procesos transcurran con la máxima eficiencia.

Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en ambos estudios de optimización, se seleccionaron tiempos de incubación de 60 y 30 minutos para las etapas 1) y 2), respectivamente.

El resto de las variables experimentales optimizadas se resumen en la **Tabla 29**.

Tabla 29: Variables experimentales optimizadas en el desarrollo del biosensor para la determinación de miRNAs basados en el empleo de Ab S9.6 como bio-receptor de detección.

<i>Variable estudiada</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>[b-anti-DNA], μM</i>	<i>0.0–1.0</i>	<i>0.1</i>
<i>$t_{\text{incubación b-anti-DNA}}$, min</i>	<i>0–60</i>	<i>30</i>
<i>Estrep-MBs, μg (μL)</i>	<i>25–100 (2.5–10.0)</i>	<i>50 (5.0)</i>
<i>Número de etapas</i>	<i>2–4</i>	<i>2</i>
<i>$t_{\text{pre-incubación Ab S9.6 + ProtA-poli-HRP40}}$, horas</i>	<i>0.5–12</i>	<i>1</i>
<i>Medio de hibridación y marcaje</i>	<i>PBS; Disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v); PBS:disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v) (1:1)</i>	<i>Disolución bloqueante de caseína al 1 % (p/v)</i>
<i>[Ab S9.6], $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>	<i>0.2–20.0</i>	<i>2.0</i>
<i>Dilución ProtA-poli-HRP40</i>	<i>1:250–1:5</i>	<i>1:25</i>
<i>$t_{\text{incubación miRNA + Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40}}$, min</i>	<i>15–60</i>	<i>30</i>

4.1.2.2.2. Curva de calibrado, características analíticas y estabilidad

Tras la selección de las condiciones experimentales más favorables para la preparación del biosensor, se evaluó la reproducibilidad del proceso de fabricación del mismo, su comportamiento analítico en presencia de concentraciones crecientes de miRNA-21 sintético, y la estabilidad con el tiempo de las b-anti-DNA-MBs.

La robustez en los procesos de modificación de las MBs y de detección electroquímica quedó demostrada por el valor de la desviación estándar relativa obtenida ($\text{RSD} = 3.1 \%$) tras comparar los valores de 10 señales amperométricas proporcionadas por distintos biosensores preparados de la misma manera, para 0.025 nM de miRNA-21 sintético.

La curva de calibrado obtenida con el biosensor desarrollado para la determinación amperométrica de miRNA-21 sintético (**Figura 92**) muestra la dependencia lineal ($r = 0.995$) entre las intensidades de corriente catódica y la concentración del miRNA diana en el intervalo comprendido entre 1.0–100 pM, con una pendiente de $(55.3 \pm 0.9) \text{ nA pM}^{-1}$ y un LD de 0.4 pM, equivalente a 10 amoles de miRNA-21 en un volumen de 25 μL de muestra, estimado como en las metodologías ya descritas empleando el criterio $3 \times s_b/m$.

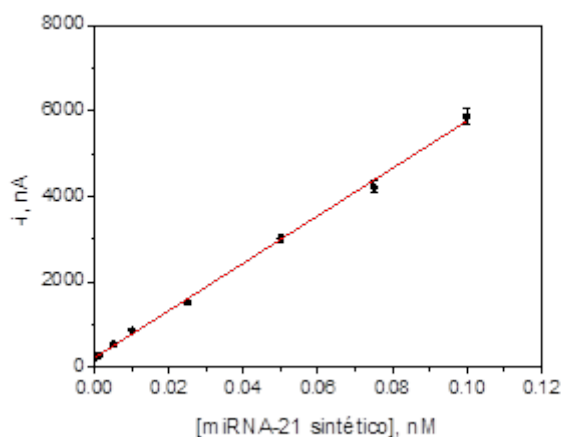


Figura 92: Curva de calibrado obtenida con el biosensor desarrollado para la determinación amperométrica de miRNA-21 sintético. $E_{app} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

El estudio de estabilidad de las b-anti-DNA-MBs preparadas y almacenadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ en disolución reguladora de PBS filtrada (pH 7.5) (resultados no mostrados) demostró que la relación S/B obtenida en ausencia (B) y en presencia (S) de 0.025 nM de miRNA-21 sintético no variaba significativamente durante los 17 días posteriores.

Es importante destacar que esta metodología proporciona un LD 6 veces inferior (0.4 pM) al de la estrategia descrita previamente basada en el empleo del Ab S9.6 como bio-receptor de captura inmovilizado sobre ProtG-MBs (Apdo. 4.1.2.2.1) (2.4 pM). Esta mayor sensibilidad puede atribuirse tanto al pequeño tamaño del epítipo de Ab S9.6 que reconoce 6 bp del heterohíbrido DNA-miRNA [Qavi, 2010], por lo que es de esperar que se enlacen aproximadamente 3 anticuerpos por cada heterohíbrido, como al empleo de la ProtA-poli-HRP40 para el marcaje enzimático, que proporciona una sensibilidad 120 veces superior ($(55314 \text{ vs. } 459) \text{ nA nM}^{-1}$) a la obtenida con biosensores preparados en idénticas condiciones

pero empleando la ProtA conjugada con una unidad de enzima (ProtA-HRP) para el marcaje del Ab S9.6.

Aunque el LD alcanzado es superior al de otros trabajos publicados recientemente para la detección electroquímica de miRNAs, basados en transducción electroquímica sobre SPCEs modificados con AuNPs y secuencias tioladas de DNA complementarias al miRNA diana y el AbS9.6 como bio-receptor de detección [Zouari, 2018^b], proteínas de dedos de zinc específicas a heterohíbridos DNA-miRNA [Fang, 2017], y estrategias de amplificación [Zhang, 2018] combinadas con diversos nanomateriales [Wang, 2017^d], el biosensor desarrollado en este trabajo resulta competitivo en términos de sencillez y tiempo de ensayo. Cabe destacar además que, como se demostrará, su sensibilidad es suficiente para aplicaciones prácticas de relevancia, y que el hecho de que no requiera nanomateriales es una ventaja importante con vistas a su futura comercialización e integración en dispositivos POC.

Otro de los aspectos relevantes de la estrategia propuesta, es la posibilidad de reducir la etapa de incubación de la mezcla conteniendo el miRNA diana y los conjugados Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 sobre las b-anti-DNA-MBs a tan solo 15 minutos, sin comprometer la sensibilidad alcanzada en las condiciones óptimas, ajustando adecuadamente la concentración de los reactivos.

Como muestran los resultados que se resumen en la **Tabla 30**, la sensibilidad de la metodología desarrollada bajo las condiciones experimentales óptimas, pero reduciendo el tiempo de incubación de las disoluciones mezcla de miRNA-21 + Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 sobre las b-anti-DNA-MBs a 15 minutos, experimentó una disminución del 37 % con respecto a la obtenida en las condiciones optimizadas, y de tan solo el 2.4 % cuando se empleaba el doble de la concentración óptima de ProtA-poli-HRP40. Esto demuestra que, ajustando debidamente la concentración del marcador enzimático ProtA-poli-HRP40, es posible emplear el biosensor desarrollado para llevar a cabo determinaciones con la misma fiabilidad y sensibilidad, pero en la mitad de tiempo, lo que resulta particularmente útil en ciertas situaciones clínicas en las que el tiempo de análisis es determinante.

Tabla 30: Variación de la sensibilidad obtenida para la determinación de miRNA-21 sintético en función del tiempo de ensayo y de las concentraciones de Ab S9.6 y ProtA-poli-HRP40 empleadas.

<i>t_{incubación}, min</i>	<i>[Ab S9.6], μg mL⁻¹</i>	<i>[ProtA-poli-HRP40], μg mL⁻¹</i>	<i>Pendiente, nA nM⁻¹</i>	<i>Sensibilidad, %</i>
30*	2.0*	2.0*	55214 ± 921	100
15	2.0	2.0	34843 ± 2542	63.1
	4.0	2.0	30844 ± 4494	55.9
	2.0	4.0	53899 ± 659	97.6
	4.0	4.0	48862 ± 4269	88.5

* condiciones óptimas

4.1.2.2.2.3. Evaluación de la selectividad de la metodología

El estudio de selectividad de la metodología se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para 0.025 nM de miRNA-21, de otros miRNAs con secuencias no complementarias (NC) y que han demostrado también papel oncogénico en cáncer de mama, como miRNA-223 y miRNA-155, y de secuencias de miRNA-21 con una base desapareada en posición central (1-m(c)) o en posición terminal (1-m(t)).

Como puede observarse en la **Figura 93**, las respuestas obtenidas en presencia de las secuencias NC eran similares a la obtenida en ausencia de miRNA-21 (0) demostrando una selectividad total frente a este tipo de secuencias. Por otro lado, las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de secuencias 1-m(c) y 1-m(t) resultaron ser del 48 y 65 %, respectivamente, de la obtenida para el miRNA diana, lo que demostró la capacidad de los biosensores desarrollados para discriminar entre secuencias homólogas e incluso entre la posición terminal o central de la base desapareada.

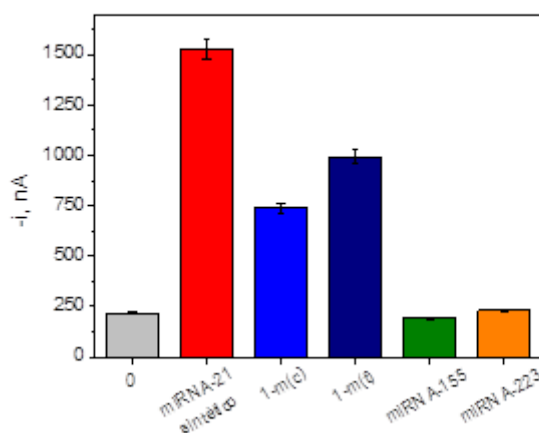


Figura 93: Evaluación de la selectividad de la metodología. Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en ausencia (0) y en presencia de 0.025 nM de miRNA-21 sintético, miRNA-21 sintético con una base desapareada en posición central (1m(c)) o en posición terminal (1m(t)) y secuencias NC sintéticas (miRNA-155 y miRNA-223). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.1.2.2.2.4. Aplicación al análisis de muestras de RNA_t extraído de células y tejidos

También se evaluó la aplicabilidad de esta metodología para el análisis de 250 ng de RNA_t extraído de células epiteliales normales no tumorigénicas (MCF-10A), células de cáncer de mama (MCF-7) y tejidos frescos de mama tumorales (T) y sus pareados no tumorales (NT), obteniéndose los resultados experimentales que se muestran en la **Figura 94**.

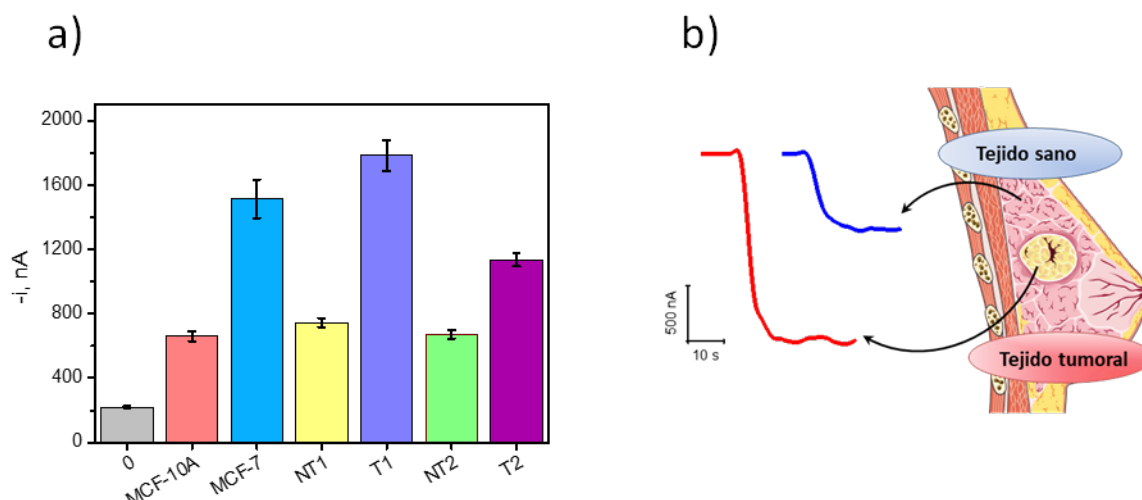


Figura 94: Determinación del contenido endógeno de miRNA-21 en células y tejidos frescos de mama. Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para la determinación del contenido endógeno de miRNA-21 maduro en 250 ng de muestras de RNA_t extraído de líneas celulares y tejidos frescos de mama (a). Amperogramas reales obtenidos para una muestra representativa de tejido fresco T y NT de una paciente diagnosticada con cáncer de mama (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

En este caso, y tras la comprobación de la existencia de efecto matriz construyendo curvas de calibrado para estándares de miRNA-21 en presencia de 250 ng de RNA_t extraído de células MCF-10A y de tejidos T de mama, respectivamente (resultados no mostrados), debido posiblemente a un mayor impedimento en los procesos de reconocimiento y marcaje enzimático del miRNA diana en presencia de otros RNAs contenidos en la matriz de la muestra, los contenidos endógenos de miRNA-21 en los distintos extractos, mostrados en la **Tabla 31**, se determinaron aplicando el método de adiciones estándar.

Tabla 31: Determinación del contenido endógeno de miRNA-21 (expresado en $\text{amol ng}^{-1} \text{RNA}_t$) en 250 ng de RNA_t extraído de células y tejidos de mama empleando el biosensor desarrollado. Se muestra también la relación entre el contenido de miRNA-21 en tejidos T y NT.

<i>Muestra</i>	<i>Tipo</i>	<i>[miRNA-21], amol ng⁻¹ RNA_t</i>	<i>Relación T/NT</i>
Línea celular	MCF-10A	0.79 ± 0.14	2.95
	MCF-7	2.33 ± 0.54	
Tejido de mama fresco	NT1	0.94 ± 0.12	2.99
	T1	2.81 ± 0.43	
	NT2	0.80 ± 0.20	2.06
	T2	1.65 ± 0.20	

Sin embargo, es importante aclarar que las investigaciones realizadas demuestran que es posible minimizar el efecto de la matriz de las muestras analizadas cuando los procesos de hibridación y marcaje enzimático de los heterohíbridos DNA-miRNA se llevaban a cabo en etapas de incubación separadas. En estas condiciones, los valores de las pendientes de los calibrados preparados en presencia de 250 ng de RNA_t de células MCF-10A ($(20.3 \pm 0.7) \text{ nA pM}^{-1}$) o de tejido T de mama ($(20 \pm 3) \text{ nA pM}^{-1}$) eran estadísticamente similares al obtenido para el calibrado del miRNA diana preparado en disolución reguladora de caseína al 1 % (p/v) ($(21 \pm 2) \text{ nA pM}^{-1}$) (resultados no mostrados). Esto demuestra que, en estas condiciones, sí sería posible cuantificar el contenido endógeno de miRNA diana en las muestras por simple interpolación de los valores de la intensidad de corriente obtenidos para cada una de ellas en la curva de calibrado externo correspondiente.

Una vez más, se obtuvieron los resultados esperables entre los niveles de expresión obtenidos para el miRNA-21 en células y tejidos T de mama, con respecto a las células sanas MCF-10A y tejidos NT, concordantes con los publicados por otros autores [Li, 2016^b], [Si, 2007], [Hug, 2015] y con los obtenidos empleando otras estrategias biosensoras desarrolladas y discutidas en esta Tesis Doctoral.

Es importante destacar, además, que la mejora en la sensibilidad con respecto a las otras estrategias desarrolladas previamente en el marco de esta Tesis Doctoral permite realizar las determinaciones empleando cantidades de muestra notablemente inferiores (250 ng de RNA_t).

Adicionalmente, y aprovechando que el mecanismo de reconocimiento del Ab S9.6 por los heterohíbridos DNA-RNA es independiente de la secuencia, también se demostró la posibilidad de “modular” la sensibilidad de la metodología variando la longitud del híbrido de DNA–RNA, formando heterohíbridos de mayor longitud que permitirían la unión de un mayor número de anticuerpos S9.6 a lo largo de su estructura. La comparación de las intensidades de corriente obtenidas tras la incubación de las MBs modificadas con secuencias de b-anti-DNA de longitudes comprendidas entre 11–80 nts con disoluciones de Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 preparadas en ausencia (B) y en presencia (S) de 100 pM de secuencias de RNA complementarias de la misma longitud a la de la b-anti-DNA inmovilizada sobre las MBs (**Figura 95**), confirmaron el aumento progresivo en la relación S/B, y por tanto, de la sensibilidad de la metodología con la longitud del heterohíbrido DNA–RNA como consecuencia de la unión de un mayor número de entidades Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40 por cada heterohíbrido.

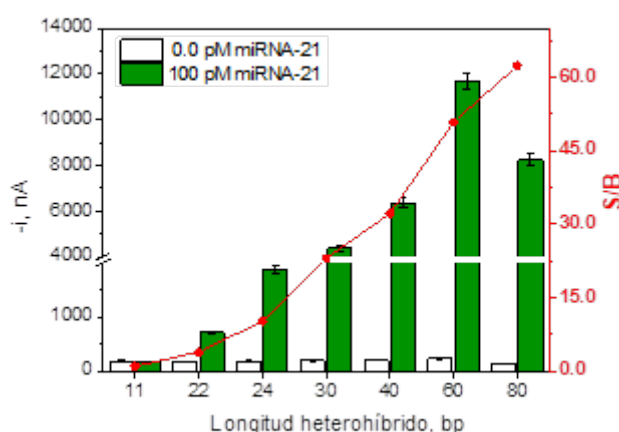


Figura 95: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras verdes, S) de 100 pM de RNAs sintéticos en función la longitud del heterohíbrido de DNA–RNA formado sobre la superficie de las MBs y su correspondiente reconocimiento mediante conjugados de Ab S9.6-ProtA-poli-HRP40. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Es indudable que estos resultados confieren a la estrategia desarrollada unas capacidades únicas que resultan tremendamente atractivas desde el punto de vista práctico, permitiendo adaptar la sensibilidad de la metodología de acuerdo a los requerimientos particulares de cada aplicación.

Además, gracias a los avances realizados en ingeniería genética y en el diseño de todo tipo de entidades moleculares modificadas, es de esperar que, de acuerdo con el formato de la estrategia propuesta, la introducción de distintas variantes enzimáticas conjugadas a un mayor número de unidades de HRP y de otras entidades señalizadoras basadas en fragmentos de anticuerpos u otros diseños moleculares, resulten fácilmente acoplables a la plataforma desarrollada que, además de ofrecer sensibilidades a la carta, por su versatilidad, puede aplicarse a la determinación de cualquier ácido nucleico (DNA o RNA) variando adecuadamente la naturaleza de la sonda biotinilada inmovilizada sobre las MBs y su longitud.

4.1.2.3. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE microRNAs EMPLEANDO ESTRATEGIAS DE AMPLIFICACIÓN BASADAS EN REACCIONES DE HIBRIDACIÓN EN CADENA (HCR)

Teniendo en cuenta los bajos niveles de concentración de los miRNAs en muestras clínicas de diversa procedencia y las dificultades asociadas con su amplificación por PCR convencional debido a su pequeño tamaño, las técnicas electroquímicas de análisis se han acoplado con otras estrategias de amplificación de ácidos nucleicos entre las que destacan: la amplificación por círculo rodante (RCA) [Wang, 2013^b], la reacción de hibridación en cadena (HCR) [Yuan, 2017], [Zhu, 2018], estrategias basadas en nucleasas específicas (DSN) [Bo, 2018], amplificación por desplazamiento [Wang, 2015^c], [Hu, 2017] y combinaciones de las anteriores [Yuan, 2018], dando lugar a metodologías con sensibilidad mejorada y adecuada para la determinación de estos biomarcadores en las muestras en las que resulta relevante su determinación. Cabe destacar que estas estrategias de amplificación, además de resultar más compatibles con la determinación de estos biomarcadores, son isotermas y mucho más sencillas de implementar que la PCR convencional en dispositivos para realizar determinaciones descentralizadas.

En este apartado se discuten los resultados que dieron lugar al artículo *Torrente-Rodríguez et al. Sensitive electrochemical determination of miRNAs based on a sandwich assay onto magnetic microcarriers and hybridization chain reaction amplification. Biosensors & Bioelectronics 86 (2016) 516–521*, adjuntado como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

De acuerdo con las premisas anteriores, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un biosensor amperométrico para la determinación de miRNA-21 basado en la estrategia de amplificación isoterma por HCR y que consiste en el empleo de cuatro secuencias de DNA sintéticas: dos secuencias lineales que actúan como elementos de reconocimiento de captura (biotinilada en el extremo 3') (b-Cp) y de detección (Dp), respectivamente, y otras dos de tipo horquilla y modificadas con biotina en el extremo 5' (b-H₁ y b-H₂). El proceso de amplificación isoterma que se desencadena cuando las secuencias b-H₁, b-H₂ y Dp coexisten en disolución comienza con una primera etapa de hibridación entre las regiones complementarias de Dp (que actúa como secuencia iniciadora de la HCR) y b-H₁ produciéndose el desplegamiento y apertura de b-H₁, cuya región libre produce a su vez la apertura de b-H₂ que hibrida con la región complementaria de b-H₁, que hibrida nuevamente con b-H₂, resultando finalmente un copolímero Dp-(b-H₁-b-H₂)_n con un gran número de unidades de biotina dispuestas de forma ordenada a lo largo del híbrido de DNA. Como consecuencia de la complementariedad de bases entre b-Cp, miRNA y Dp, el miRNA objetivo es finalmente detectado mediante una configuración de tipo sándwich, hibridando con b-Cp, previamente inmovilizada sobre la superficie de Estrep-MBs, y con la región libre de Dp, de modo que solo en presencia del miRNA diana, el copolímero ((Dp-(b-H₁-b-H₂)_n) obtenido tras la HCR queda anclado a la superficie de las MBs modificadas con la b-Cp, originando en última instancia una amplificación de la señal tras el marcaje enzimático con Estrep-HRP de las múltiples unidades de biotina dispuestas a lo largo del mismo.

El fundamento de la metodología, esquematizado en la **Figura 96**, consiste en tres etapas principales: la inmovilización de b-Cp sobre Estrep-MBs, la hibridación directa sobre las b-Cp-MBs del conjunto miRNA-Dp-(b-H₁-b-H₂)_n formado en disolución tras el proceso de HCR, y el marcaje enzimático de las unidades de biotina del copolímero de DNA resultante con Estrep-HRP.

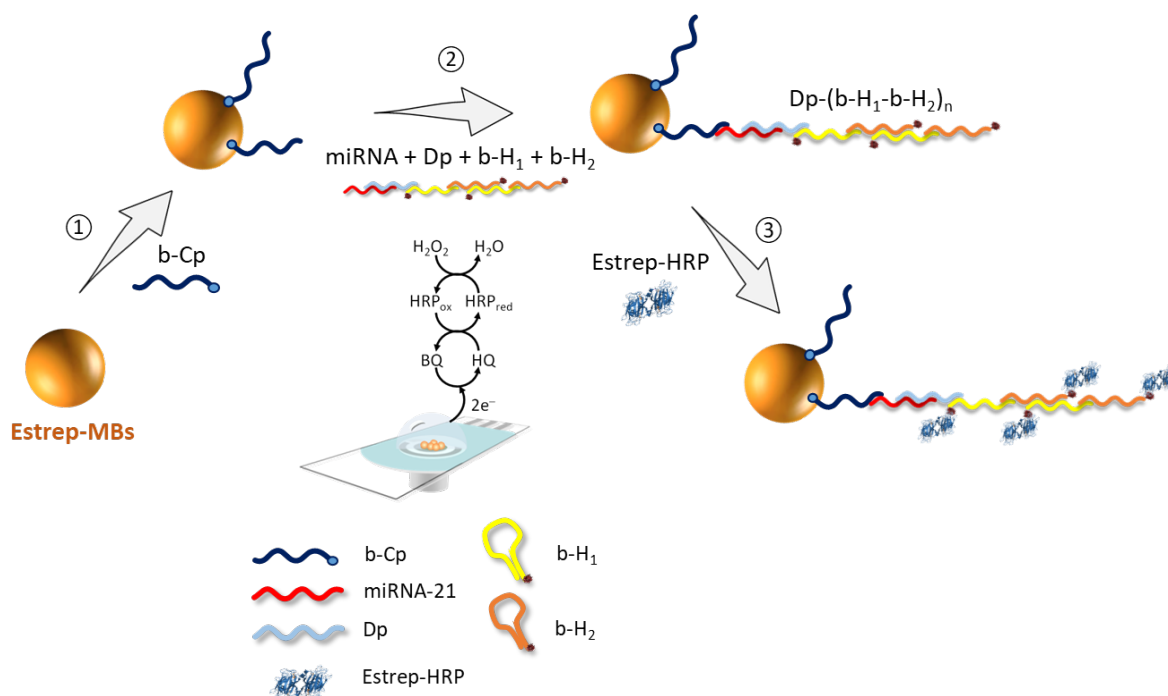


Figura 96: Etapas involucradas en la preparación del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de miRNA-21 basado en una estrategia de amplificación por HCR. Inmovilización de $b\text{-Cp}$ sobre Estrep-MBs (1), captura selectiva de los conjugados $\text{miRNA-Dp-(b-H}_1\text{-b-H}_2\text{)}_n$ formados en disolución homogénea (2), y marcaje enzimático de las unidades de biotina con Estrep-HRP (3) para llevar a cabo la detección amperométrica de los procesos de afinidad involucrados.

La viabilidad de la estrategia, así como del proceso de amplificación por HCR se demostraron comparando las respuestas obtenidas para 0.0 (B) y 5.0 nM (S) de miRNA-21 sintético, en ausencia y en presencia de cada una de las secuencias de DNA involucradas en el proceso de amplificación por HCR (Dp , $b\text{-H}_1$ y $b\text{-H}_2$). Los resultados obtenidos y representados en la **Figura 97** confirmaron que la estrategia de amplificación propuesta para la determinación del miRNA de interés resulta viable únicamente en presencia de las tres secuencias (Dp , $b\text{-H}_1$ y $b\text{-H}_2$). Además, la comparación de los resultados obtenidos en presencia de las tres sondas (barras 4) y en ausencia de $b\text{-H}_2$ (barras 3) confirma la mayor relación S/B y por tanto la amplificación en la respuesta obtenida como consecuencia del proceso de HCR.

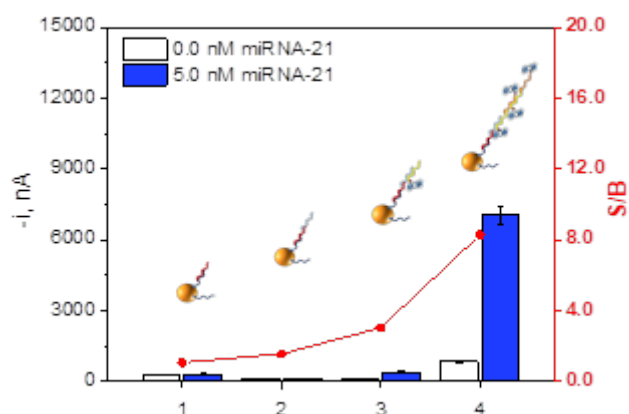


Figura 97: Evaluación de la viabilidad de la estrategia de amplificación por HCR. Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras azules, S) de 5.0 nM de miRNA-21 sintético tras el desarrollo de la metodología en ausencia de Dp (1), b-H₁ (2), b-H₂ (3), y en presencia de todos los componentes involucrados en el proceso de HCR. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

Con el objetivo de evaluar el tipo de sonda de captura (lineal o de tipo horquilla) más apropiada para el desarrollo de la metodología, se compararon los resultados anteriores con los obtenidos modificando las Estrep-MBs con una sonda de captura de tipo horquilla biotinilada en su extremo 5' (b-HCp) y complementaria al miRNA diana, que solo cuando se abre selectivamente en presencia del miRNA diana es capaz de hibridar con la sonda de DNA iniciadora, designada como S₀, e iniciar el proceso de HCR en presencia de b-H₁ y b-H₂.

Las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de b-Cp-MBs con Dp-(b-H₁-b-H₂)_n y de b-HCp-MBs con el miRNA objetivo seguido de su incubación con S₀-(b-H₁-b-H₂)_n, respectivamente, en ausencia y en presencia de 2.5 y 5.0 nM de miRNA-21, que se muestran en la **Figura 98a**, confirmaron que la estrategia basada en b-HCp y S₀ proporcionaba una peor discriminación de la presencia de miRNA-21. Además, la elevada intensidad de corriente catódica obtenida en ausencia de miRNA-21, indicativa de la unión con b-HCp de los conjugados S₀-(b-H₁-b-H₂)_n formados en disolución, demuestra que la apertura de la b-HCp no es estrictamente dependiente de la presencia del miRNA diana.

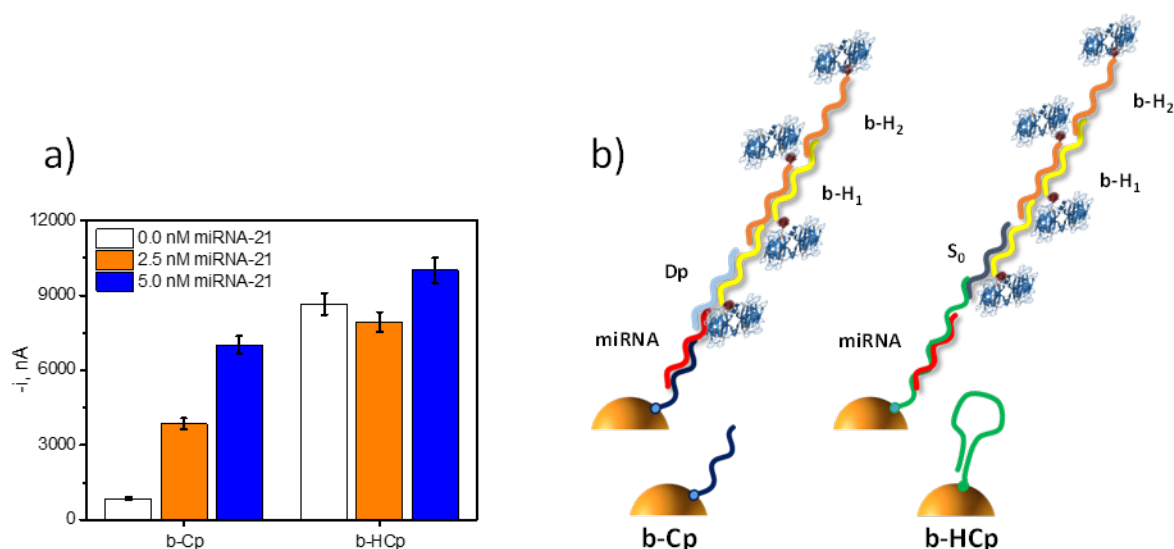


Figura 98: Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores desarrollados tras el proceso de HCR empleando Estrep-MBs modificadas con sondas de captura biotiniladas de DNA lineal (b-Cp) y tipo horquilla (b-HCp) en ausencia (0.0 nM) y en presencia de 2.5 y 5.0 nM de miRNA-21 sintético (a). Diagrama esquemático de los conjugados resultantes del proceso de amplificación por HCR empleando las sondas iniciadoras correspondientes (Dp con b-Cp o S₀ con b-HCp) y b-H₁ y b-H₂ (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

4.1.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Se optimizaron las variables experimentales involucradas en el funcionamiento de la metodología propuesta, comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 5.0 nM de miRNA-21 sintético. En este caso se discuten como ejemplo solo los resultados obtenidos en los estudios de optimización de las concentraciones de b-Cp y Dp, así como de la evaluación del número de etapas involucradas en la metodología.

- Optimización de la concentración de las sondas b-Cp y Dp

La influencia de la concentración de ambas secuencias de DNA se evaluó en los rangos comprendidos entre 0.0–5.0 μ M y 0.0–2.0 μ M para b-Cp y Dp, respectivamente (**Figura 99**).

Los resultados obtenidos en la optimización de la concentración de b-Cp (**Figura 99a**) indicaron que la relación S/B aumentaba con la concentración de b-Cp hasta un valor de 2.0 μ M, a partir del cual disminuía gradualmente debido a la disminución en la eficiencia de la hibridación como consecuencia del impedimento estérico por el exceso de b-Cp inmovilizada sobre las MBs. Es importante mencionar que las elevadas intensidades de corriente obtenidas

en ausencia de miRNA-21 para bajas concentraciones de b-Cp se atribuyen a la inmovilización directa del copolímero de DNA biotinilado sobre las Estrep-MBs. Como puede observarse, estas señales inespecíficas disminuían significativamente y permanecían prácticamente constantes cuando se modificaban las Estrep-MBs con concentraciones de b-Cp de 2.0 μM . Estos resultados confirman que en estas condiciones no hay Estrep libres en la superficie de las MBs a las que se pueda unir de forma directa el copolímero biotinilado y que su inmovilización solo se va a producir en presencia del miRNA diana.

Del estudio de la influencia de la concentración de la secuencia Dp (**Figura 99b**) se demuestra que el proceso de amplificación no tenía lugar en ausencia de Dp y que, en estas condiciones, b-H₁ y b-H₂ mantenían su estructura tipo horquilla y no era posible la hibridación secuencial entre ellas. Como puede observarse en la misma Figura, las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 5.0 nM de miRNA-21 aumentaban progresivamente con la concentración de la sonda iniciadora del proceso HCR, alcanzándose la mayor relación S/B para un valor de 0.25 μM , a partir del cual disminuía bruscamente como consecuencia del aumento de las intensidades de corriente inespecíficas obtenidas en ausencia de miRNA-21.

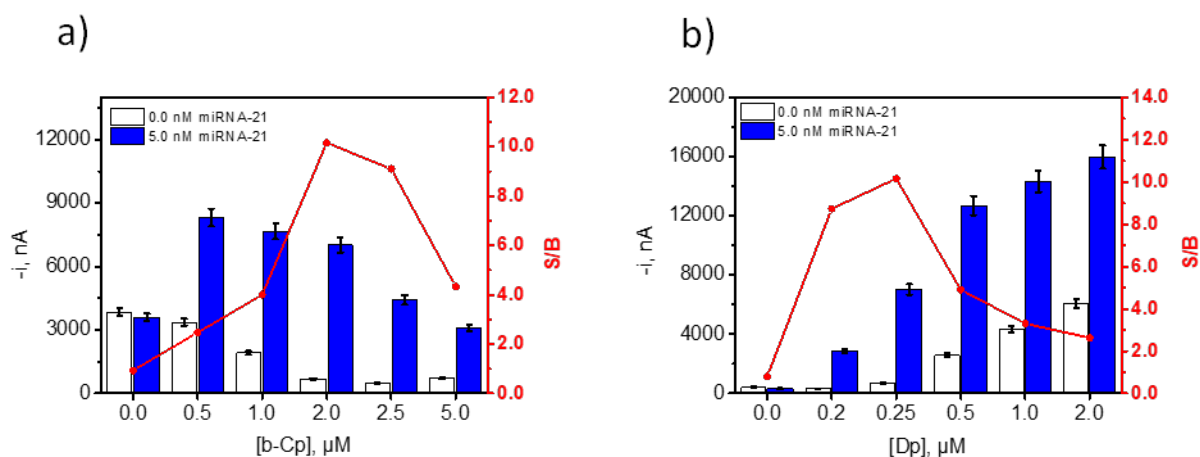


Figura 99: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras azules, S) de 5.0 nM de miRNA-21 en función de las concentraciones de la sonda de captura de DNA biotinilada (b-Cp) (a) y de la sonda de detección iniciadora del proceso HCR (Dp) (b). $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

- Evaluación del número de etapas

El procedimiento experimental más apropiado para la fabricación del biosensor se seleccionó comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 5.0 nM de miRNA-21 sintético, en función de distintos protocolos de preparación descritos en la **Tabla 32**.

Tabla 32: Descripción de las etapas involucradas en los distintos protocolos evaluados en el desarrollo de biosensores para la determinación de miRNA-21 basados en amplificación por HCR.

<i>Protocolo</i>	<i>Detalle de las etapas involucradas en cada protocolo evaluado</i>	<i>Tiempo de ensayo</i>
1	1) Inmovilización de b-Cp sobre Estrep-MBs → b-Cp-MBs (60 min)	
	2) Incubación de b-Cp-MBs con disolución mezcla conteniendo miRNA Dp+ b-H1 + b-H2 (15 min)	1 h
	3) Marcaje enzimático de (b-H2-b-H1) _n -Dp-miRNA-b-Cp-MBs con Estrep HRP (30 min)	45 min
2	1) Inmovilización de b-Cp sobre Estrep-MBs → b-Cp-MBs (60 min)	
	2) Hibridación del miRNA diana con b-Cp-MBs → miRNA-b-Cp-MBs (60 min)	2 h
	3) Incubación de miRNA-b-Cp-MBs con disolución mezcla conteniendo Dp + b-H ₁ + b-H ₂ (15 min)	45 min
	4) Marcaje enzimático de (b-H2-b-H1) _n -Dp-miRNA-b-Cp-MBs con Estrep-HRP (30 min)	
3	1) Inmovilización de b-Cp sobre Estrep-MBs → b-Cp-MBs (60 min)	
	2) Hibridación del miRNA diana con b-Cp-MBs → miRNA-b-Cp-MBs (60 min)	
	3) Hibridación de Dp con miRNA-b-Cp-MBs → Dp-miRNA-b-Cp-MBs (60 min)	3 h
	4) Incubación de Dp-miRNA-b-Cp-MBs con disolución mezcla conteniendo b-H1 + b-H2 (15 min)	45 min
	5) Marcaje enzimático de (b-H2-b-H1) _n -Dp-miRNA-b-Cp-MBs con Estrep-HRP (30 min)	

Los resultados de la **Figura 100a** demostraron que el *protocolo 1* en el que el miRNA diana y las tres sondas (Dp, b-H₁ y b-H₂) coexisten en disolución, proporcionaba la mayor relación S/B. La disminución observada para los *protocolos 2* y *3* puede atribuirse a que la concentración de Dp capturada por las miRNA-b-Cp-MBs en estos casos era limitante y no resultaba suficiente para lograr la máxima eficiencia en el proceso de HCR [Wang, 2013^c].

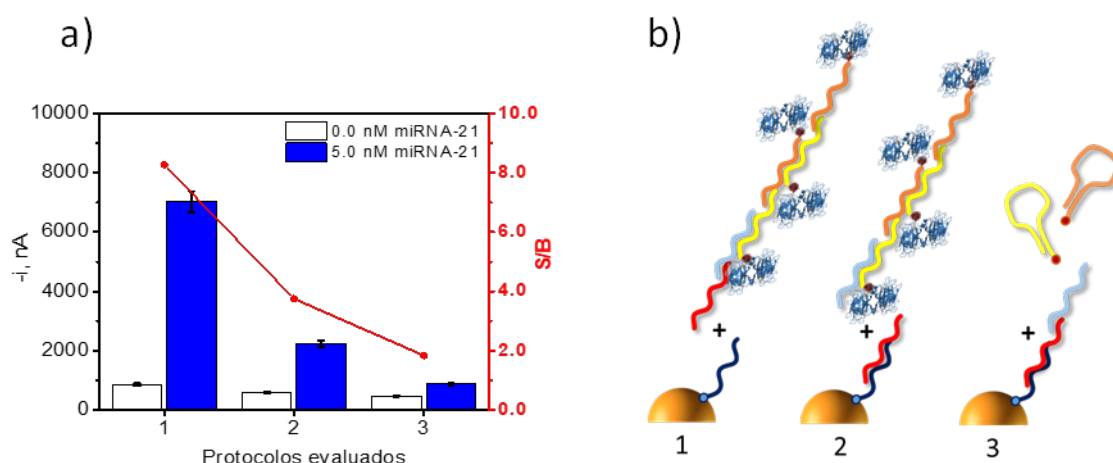


Figura 100: Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con biosensores preparados de acuerdo con los distintos protocolos evaluados en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras azules, S) de 5.0 nM de miRNA-21 sintético (a). Esquemas de las principales etapas involucradas en cada protocolo (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

En la **Tabla 33** se resumen el resto de las variables experimentales optimizadas junto con los rangos evaluados y los valores seleccionados para cada una de ellas.

Tabla 33: Resumen de las variables experimentales optimizadas que afectan al desarrollo y funcionamiento del biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21 basado en estrategias de amplificación por HCR.

Variable	Rango evaluado	Valor seleccionado
Estrep-MBs, μg (μL)	--	50 (5.0)
[b-Cp], μM	0.0–5.0	2.0
[Dp], μM	0.0–2.0	0.25
[b-H ₁ + b-H ₂], μM	0.0–2.0	0.5
Estrep-HRP, dilución	1:10000–1:1000	1:2500
$t_{pre-incubación\ miRNA-21 + Dp + b-H1 + b-H2}$, min	0–120	0
$t_{incubación\ miRNA-21 + Dp + b-H1 + b-H2\ sobre\ Cp-MBs}$, min	15–90	15
$t_{incubación\ Estrep-HRP}$	--	30

4.1.2.3.2. CURVA DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

Se caracterizó el comportamiento analítico del biosensor desarrollado construyéndose la curva de calibrado para concentraciones crecientes de miRNA-21 sintético

que se muestra en la **Figura 101** y en la que se demuestra la dependencia lineal entre las respuestas amperométricas y la concentración de miRNA-21 sintético en el intervalo de concentración comprendido entre 0.2 y 5.0 nM ($r = 0.997$), con una pendiente de (1250 ± 27) nA nM⁻¹ y una ordenada en el origen de (726 ± 54) nA.

El factor de amplificación de la señal amperométrica obtenido en presencia de HCR se demostró comparando la sensibilidad alcanzada con biosensores preparados en presencia de todas las secuencias necesarias para que ocurra el proceso de amplificación, y otros en ausencia de la sonda b-H₂, de manera que en este último caso el miRNA diana se determinaba empleando una configuración convencional de tipo sándwich, obteniéndose bioconjugados magnéticos de tipo Estrep-HRP-b-H₁-Dp-miRNA-b-Cp-MBs. Los resultados obtenidos (**Figura 101a**) confirmaron que los biosensores basados en el empleo de HCR permitían determinar el miRNA diana con una sensibilidad 24 veces superior a la que proporcionaban los preparados con la estrategia convencional de hibridación tipo sándwich.

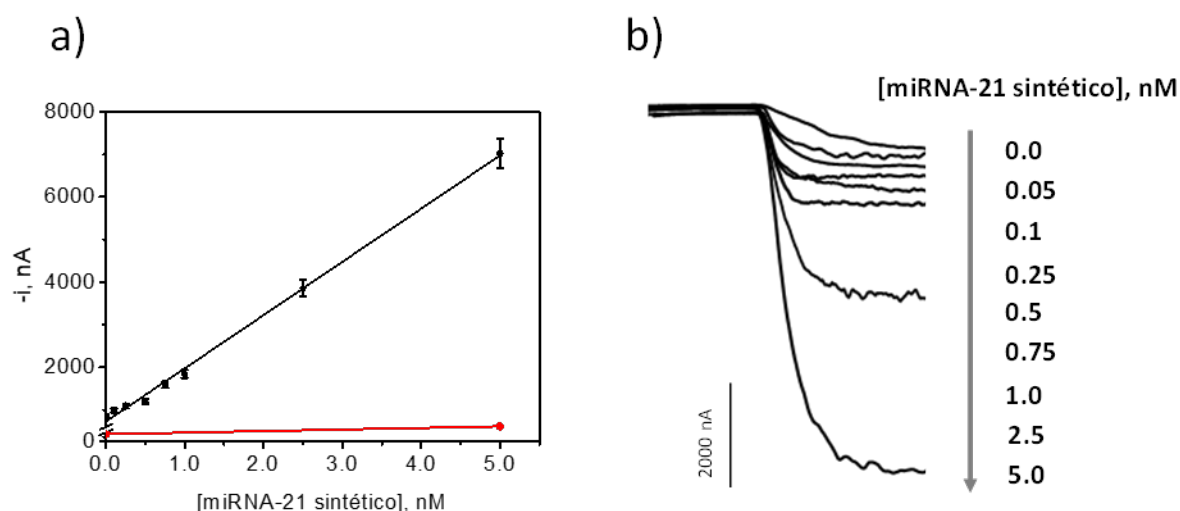


Figura 101: Curvas de calibrado obtenidas para la determinación de miRNA-21 sintético con biosensores basados en HCR (●) y con una estrategia convencional de hibridación tipo sándwich (en ausencia de b-H₂) (●) (a). Amperogramas reales obtenidos con biosensores basados en HCR para las concentraciones indicadas de miRNA-21 sintético (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Los valores de los LD y LC, estimados como 3 y $10 \times s_b/m$, siendo s_b la desviación estándar de 10 respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de miRNA-21 y m la pendiente de la curva de calibrado representada en la **Figura 101a**, y el valor de RSD obtenido

tras la preparación de 10 biosensores diferentes de la misma manera, en presencia de 5.0 nM de miRNA-21, resultaron de 0.06, 0.2 nM y 5.0 %, respectivamente. Así, la caracterización del comportamiento analítico del biosensor desarrollado basado en HCR para la determinación amperométrica de miRNA-21 sintético demostró un rango operacional aceptable, un LD 85 veces inferior al reportado por Oishi y col. [Oishi, 2015] para la determinación de miRNA-144 empleando MBs, amplificación mediante HCR y detección por fluorescencia, y una gran reproducibilidad en los procesos de: modificación de las MBs, amplificación por HCR y detección electroquímica.

Aunque hasta el momento se han descrito algunas estrategias biosensoras electroquímicas para la determinación de miRNAs basadas en procesos de amplificación por HCR [Miao, 2015^c], [Zhai, 2015], [Liang, 2018] que ofrecen unos LD considerablemente inferiores al obtenido con el biosensor desarrollado en este trabajo, es importante resaltar que la metodología propuesta destaca principalmente por su simplicidad, bajo coste y ausencia de protocolos complejos de modificación de la superficie transductora y/o de nanomateriales.

Además, los biosensores fabricados a partir de conjugados b-Cp-MBs preparados con antelación y almacenados a 4 °C en disolución reguladora de PBS filtrada (pH 7.5), proporcionaron respuestas amperométricas para disoluciones de miRNA-21 sintético de 2.5 nM dentro de los límites superior e inferior del gráfico de control construido (resultados no mostrados), durante los 15 días posteriores a su preparación.

4.1.2.3.3. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA

La selectividad de la metodología se evaluó comparando las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de 2.5 nM del miRNA-21 diana sintético, miRNA-21 con una base desapareada en la región de hibridación con b-Cp (1-mcp) o en la región de hibridación con Dp (1-mdp), y secuencias no complementarias (NC) de dos de los miRNAs más relevantes en cáncer de mama: miRNA-205 y miRNA-192.

Los resultados obtenidos, representados en la **Figura 102a**, confirman la discriminación total que proporciona el biosensor desarrollado hacia secuencias NC y aceptable frente a secuencias de miRNAs homólogas con una base desapareada, con

respuestas 3.1 (1-mcp) y 1.8 (1-mdp) veces inferiores a la obtenida en presencia del miRNA diana.

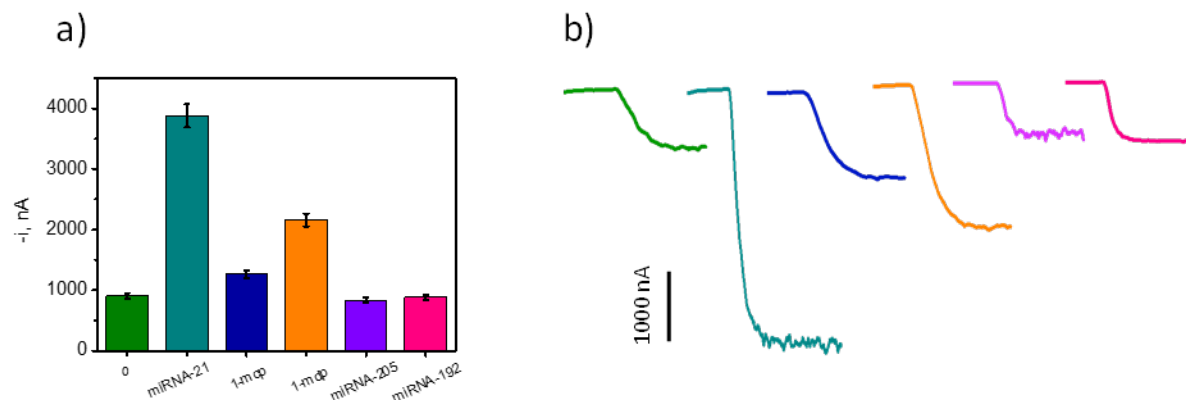


Figura 102: Estudio de selectividad del biosensor basado en HCR. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (0) y en presencia de 2.5 nM de miRNA-21, miRNA-21 con una base desapareada en la región de hibridación con b-Cp (1-mcp) o en la región de hibridación con Dp (1-mdp), miRNA-205 y miRNA-192 sintéticos (a). Amperogramas obtenidos con los biosensores preparados para cada una de las secuencias sintéticas evaluadas (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

La mayor discriminación que resulta frente a secuencias 1-mcp que para 1-mdp puede deberse a que la hibridación del miRNA-21 y Dp ocurre en disolución homogénea, mientras que la hibridación entre miRNA-21 y b-Cp ocurre sobre la superficie de las MBs (b-Cp-MBs). En general los procesos de hibridación que ocurren en fase heterogénea son menos favorables y más restrictivos, hecho que puede justificar la mayor discriminación obtenida para 1-mcp [Springer, 2010].

4.1.2.3.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA_t EXTRAÍDO DE CÉLULAS Y TEJIDOS

La aplicabilidad práctica de este biosensor basado en HCR se evaluó determinando el contenido endógeno de miRNA-21 en 500 ng de RNA_t extraído de células de cáncer de mama (MCF-7) y epiteliales normales (MCF-10A) y en 1.0 µg de RNA_t extraído de tejidos frescos T y NT de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

Los valores de las respuestas amperométricas obtenidas para cada uno de los extractos analizados (**Figura 103**) confirmaron nuevamente la hiperexpresión de miRNA-21

en células de cáncer de mama (MCF-7) y en todos los tejidos T ensayados, en comparación con la de células normales MCF-10A y los tejidos NT (nuevamente por su similitud, solo se presentan los resultados de una muestra).

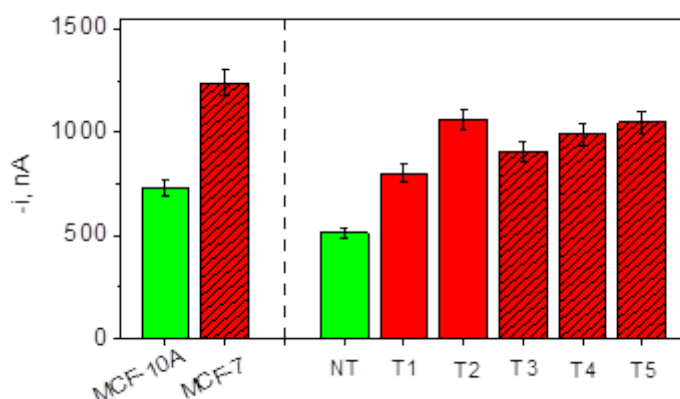


Figura 103: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado para la determinación de miRNA-21 en RNA_t extraído de células epiteliales normales (MCF-10A) y de cáncer de mama (MCF-7), y de tejidos frescos tumorales (T) y no tumorales (NT) de mama, empleando 500 ng y 1.0 µg de RNA_t, respectivamente. E_{app} = -0.2 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

Debido a la ausencia de diferencias significativas entre los valores de las pendientes de las curvas de calibrado construidas para estándares de miRNA-21 sintético (disolución reguladora de citrato de sodio salino (SSC) (pH 7.5)) mostrada en la **Figura 101a** (1250 ± 27) nA nM⁻¹, y en presencia de cantidades iguales o inferiores a 1.0 µg de RNA_t de células MCF-10A (1316 ± 45) nA nM⁻¹, el nivel endógeno de miRNA-21 se obtuvo por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada muestra en la curva de calibrado construida para miRNA-21 sintético, obteniéndose unos contenidos del miRNA diana de (21 ± 3) y (0.7 ± 0.1) amol ng⁻¹ RNA_t en células MCF-7 y MCF-10A, respectivamente, y comprendidos en un rango entre 1.9–7.0 amol ng⁻¹ RNA_t para los tejidos T, con unas relaciones de expresión T/NT correspondientes a 1.6–2.1, de nuevo perfectamente concordantes con los que proporcionan otras estrategias electroquímicas presentadas en esta Tesis Doctoral y los descritos por otros autores [Xu, 2016], [Savad, 2012].

Las características analíticas y los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales obtenidos con el biosensor desarrollado, que combina de forma pionera el empleo de MBs comerciales funcionalizadas y la estrategia de amplificación por HCR, demuestran su

aplicabilidad para el diagnóstico y seguimiento de pacientes oncológicos mediante la determinación sensible y fiable de miRNAs, en menos de 1 hora, empleando un protocolo sencillo que opera a temperatura ambiente.

4.2. PLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA MULTIDETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

En esta última sección de plataformas biosensoras se presentan los resultados más relevantes obtenidos en la multideterminación de biomarcadores circulantes de cáncer del mismo o distinto nivel molecular. Estas plataformas están basadas en el empleo de MBs comerciales, receptores de afinidad (anticuerpos, proteínas virales y sondas de DNA y RNA) y electrodos serigrafiados duales de carbono (SPdCEs).

4.2.1. PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE LA MISMA NATURALEZA: microRNAs

Teniendo en cuenta la complejidad de los sistemas biológicos, y en particular, la heterogeneidad de los procesos cancerígenos, la determinación de un único biomarcador resulta insuficiente para la elaboración de diagnósticos precisos. Por tanto, la clínica actual demanda el desarrollo de plataformas sencillas y de rápida respuesta que permitan la detección simultánea de biomarcadores del mismo o de distinto nivel molecular, con el fin de mejorar la fiabilidad del diagnóstico incluso en las etapas más tempranas de la enfermedad.

Teniendo en cuenta el excelente comportamiento analítico demostrado por los biosensores desarrollados para la determinación individual de miRNAs presentados en los Apdos. 4.1.2.1.1 y 4.1.2.2.1 de esta Tesis Doctoral, y que la determinación simultánea de estos pequeños reguladores permite conocer en detalle las bases moleculares de su patrón de expresión en cada tipo de neoplasia y en cada una de las etapas de su desarrollo [Matin, 2018] así como caracterizar y diagnosticar de forma inequívoca el subtipo molecular de la enfermedad [Weishaupt, 2013], se han desarrollado dos plataformas amperométricas para la determinación dual de miRNAs basadas en el empleo de la proteína viral p19 y el anticuerpo específico S9.6 como bio-receptores de captura, respectivamente, y SPdCEs como transductores electroquímicos.

4.2.1.1. BIOSENSORES BASADOS EN PROTEÍNAS VIRALES

Se resumen en este apartado los resultados del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Simultaneous detection of two breast cancer-related miRNAs in tumor tissues using p19-based disposable amperometric magnetobiosensing platforms. Biosensors & Bioelectronics 66 (2015) 385–391*, incluido como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Sabiendo que las propiedades de la proteína p19 permiten su aplicación como receptor para la captura específica y selectiva de híbridos de RNA de un tamaño comprendido entre 19–22 nts, independientemente de la secuencia de bases del RNA diana, la estrategia desarrollada para la determinación individual del oncogén miRNA-21, basada en la inmovilización de la proteína p19 sobre la superficie de partículas magnéticas de quitina (Quitina-MBs) a través del dominio de quitina del receptor proteico (CBD), se trasladó sobre la superficie de electrodos serigraviados de carbono conteniendo dos superficies transductoras (SPdCE), para la determinación simultánea de biomarcadores del mismo nivel molecular de relevancia clínica y diagnóstica destacada en cáncer de mama: el oncogén no específico miRNA-21 y el supresor tumoral específico miRNA-205.

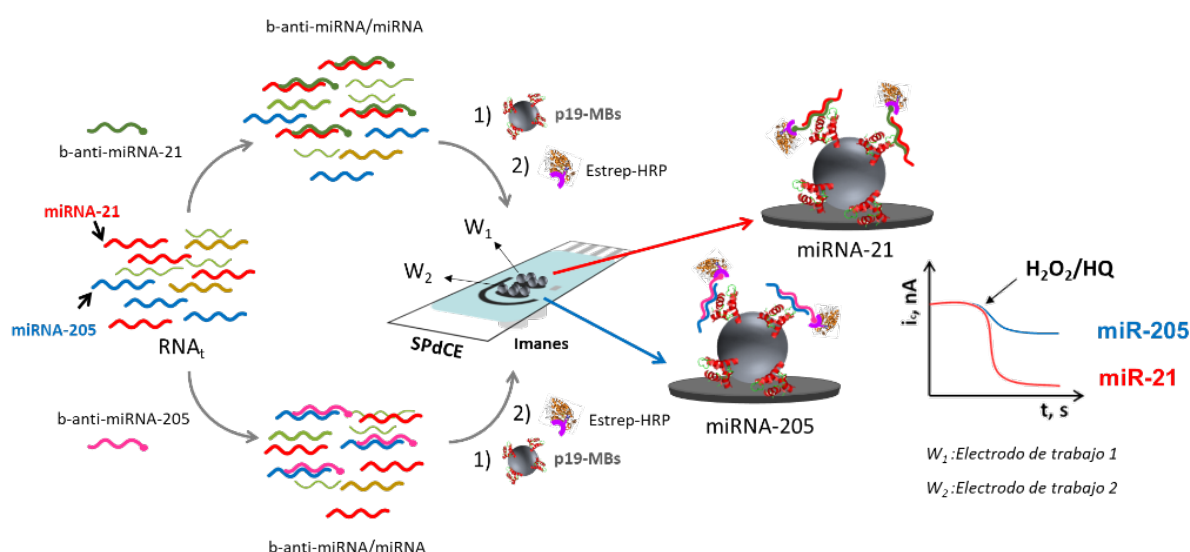


Figura 104: Esquema del fundamento de la metodología puesta a punto para la determinación dual de miRNA-21 y miRNA-205 basada en la captura específica de los híbridos de RNA correspondientes a cada miRNA (b-anti-miRNA/miRNA) mediante p19-MBs (1) y el correspondiente marcaje enzimático de b-anti-miRNA/miRNA-p19-MBs con el conjugado Estrep-HRP (2).

El procedimiento experimental seguido para la preparación de la plataforma biosensora consistió en una primera etapa de hibridación homogénea, a 25 °C y 250 rpm, de

disoluciones mezcla conteniendo el miRNA de interés en cada caso (miRNA-21 o miRNA-205) y su sonda complementaria de RNA biotinilada en el extremo 3' (biotin-anti-miRNA-21 o biotin-anti-miRNA-205, respectivamente), obteniéndose los homohíbridos b-anti-miRNA/miRNA correspondientes.

A continuación, tras la preparación de distintos lotes de p19-Quitina-MBs (uno para cada miRNA objetivo), se llevó a cabo la captura específica de los homohíbridos de b-anti-miRNA/miRNA formados previamente, mediante su incubación con las p19-Quitina-MBs, y finalmente, los conjugados b-anti-miRNA/miRNA-p19-Quitina-MBs obtenidos para cada miRNA se incubaron con Estrep-HRP para proceder al marcaje enzimático de los mismos. Las MBs modificadas para la determinación de cada uno de los miRNAs diana se capturan magnéticamente sobre cada uno de los electrodos de trabajo de los SPdCEs y se realiza la transducción amperométrica en presencia de H_2O_2 /HQ, tal y como se esquematiza en la **Figura 104**.

4.2.1.1.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Dado que la metodología empleada para la detección simultánea de ambos biomarcadores genéticos comparte el mismo tipo de partículas magnéticas (Quitina-MBs), bio-receptor de captura (proteína p19) y conjugado enzimático (Estrep-HRP), las variables experimentales empleadas para la fabricación de la bioplataforma dual fueron las mismas optimizadas previamente en la fabricación de biosensores para determinación individual y resumidas en la **Tabla 24** discutidas en el Apdo. 4.1.2.1.1.1.

4.2.1.1.2. EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA EN LA DETECCIÓN DE AMBOS BIOMARCADORES

Uno de los requisitos indispensables para asegurar la fiabilidad de los resultados que proporcionan las plataformas multiplexadas y la ausencia de falsos positivos y negativos, es demostrar la ausencia de reactividad cruzada entre las superficies electródicas adyacentes [Escamilla-Gómez, 2009].

Con este fin, se compararon las respuestas amperométricas proporcionadas por las bioplataformas duales para disoluciones mezcla que contenían concentraciones variables de miRNA-21 y miRNA-205 sintéticos, preparadas en disolución reguladora 1x p19 (pH 7.0).

Las intensidades de corriente obtenidas, representadas en la **Figura 105**, confirmaron la ausencia de reactividad cruzada y de procesos de difusión de las especies involucradas durante la transducción, lo que confirmó la viabilidad de la plataforma propuesta para la determinación fiable y simultánea de ambos biomarcadores.

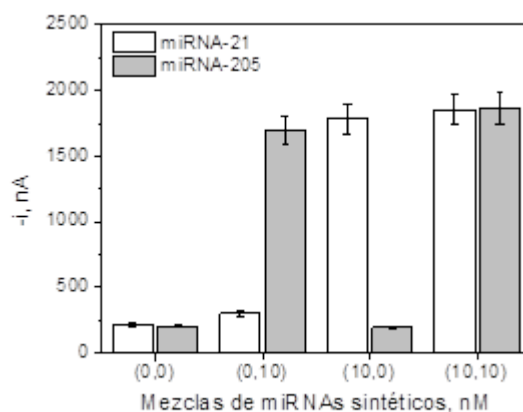


Figura 105: Evaluación de la reactividad cruzada de la metodología desarrollada. Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor dual para la determinación simultánea de ambos miRNAs en disoluciones mezcla que contenían las siguientes concentraciones de miRNA-21 y miRNA-205 (en nM): (0,0), (0,10), (10,0) y (10,10). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.2.1.1.3. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Una vez demostrada la fiabilidad para la determinación dual, se caracterizó el comportamiento analítico de las bioplataformas desarrolladas para la determinación simultánea de disoluciones de ambos miRNAs sintéticos preparadas en disolución reguladora 1×10^{-9} M (pH 7.0).

La variación de la intensidad de corriente en función de la concentración de cada miRNA sintético, mostradas en la **Figura 106** demostraron la dependencia lineal de las mismas en el rango de concentración comprendido entre 2.0–10.0 nM de miRNA-21 y miRNA-205, con unos valores para las pendientes de (161 ± 7) y (165 ± 5) nA nM⁻¹ y unos LD, calculados en base al criterio $3 \times s_b/m$, siendo s_b la desviación estándar de 10 medidas amperométricas obtenidas en ausencia del miRNA diana, y m la pendiente de las curvas de calibrado correspondientes, de 0.61 y 0.62 nM, respectivamente.

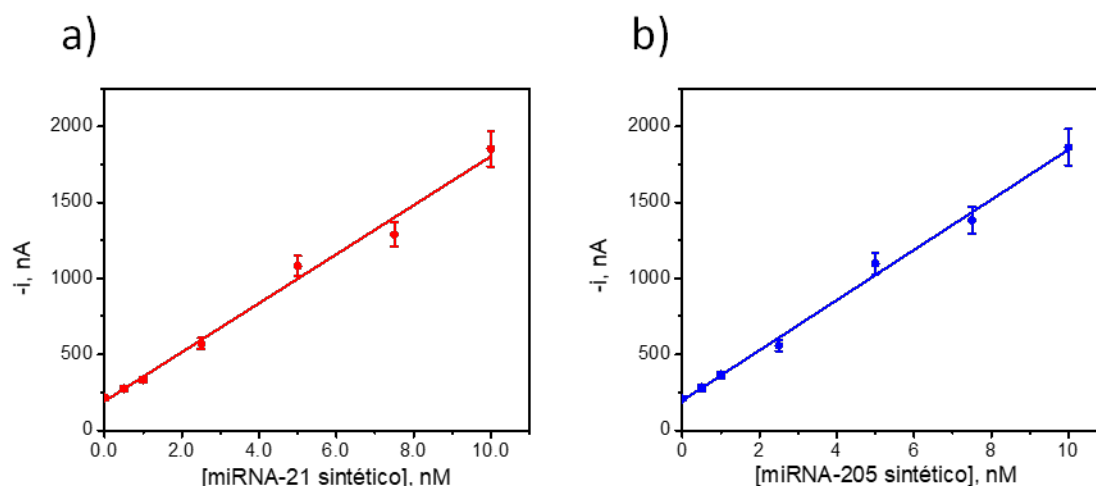


Figura 106: Curvas de calibrado obtenidas con la plataforma biosensora dual desarrollada para la determinación simultánea de miRNA-21 (a) y miRNA-205 (b) sintéticos preparados en disolución reguladora 1×10^{-19} M. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Aunque recientemente se han publicado distintas bioplataformas electroquímicas para la determinación simultánea de miRNA-182 y miRNA-381 en muestras de suero de pacientes diagnosticados con glioma en diferentes estadios [Wang, 2017^c], y de miRNA-106a y let-7a en muestras de plasma realizando estudios de recuperación [Daneshpour, 2018], que ofrecen unos LD en el rango de fM, y por tanto, significativamente inferiores a los de la plataforma desarrollada (0.61 nM para miRNA-21 y 0.62 nM para miRNA-205), como se demostrará en el apartado de aplicabilidad, la sensibilidad alcanzada con la plataforma dual propuesta resultó adecuada para la determinación de ambos miRNAs en extractos de RNA_t de células y tejidos de mama. De nuevo, las bioplataformas desarrolladas resultan ventajosas en comparación con las descritas en la literatura por su sencilla y rápida preparación, que no requiere ni la modificación de superficies electrónicas ni el empleo/modificación de nanomateriales.

Es importante destacar además que los LDs obtenidos eran ~10 veces superiores a los alcanzados con los biosensores para determinación individual de miRNAs empleando la misma metodología, lo que puede atribuirse a la diferencia existente entre el área superficial activa de los electrodos de trabajo de los SPdCE y del SPCE (6.3 vs. 12.6 mm², respectivamente).

La reproducibilidad asociada al proceso de preparación de la bioplataforma que incluyen la modificación de las MBs, su captura magnética sobre la superficie de los electrodos de trabajo del SPdCE y la detección amperométrica de cada miRNA diana, se evaluó preparando 8 biosensores duales y comparando las respuestas amperométricas que proporcionaban para mezclas que contenían 5.0 nM de cada miRNA sintético. Los valores de RSD obtenidos de 6.3 % (miRNA-21) y 6.4 % (miRNA-205), confirmaron la reproducibilidad de todos los protocolos involucrados.

4.2.1.1.4. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA

A continuación, se evaluó la selectividad del biosensor dual frente a secuencias sintéticas de miRNAs no complementarias (NC) (NC₁: miRNA-205 ó miRNA-21; NC₂: miRNA-192), secuencias complementarias con una base desapareada en posición central (1-m), y frente a mezclas de NC₁ y NC₂.

La excelente discriminación frente a secuencias NC, así como frente a disoluciones conteniendo mezcla de todas ellas, en ausencia y en presencia de cada miRNA diana, quedó demostrada comparando las respuestas amperométricas obtenidas en cada caso con las que resultan en ausencia y en presencia de 5.0 nM de cada miRNA diana sintético (**Figura 107**). Estos resultados, similares a los obtenidos para la determinación individual, confirman la selectividad total obtenida hacia secuencias NC y aceptable hacia 1-m.

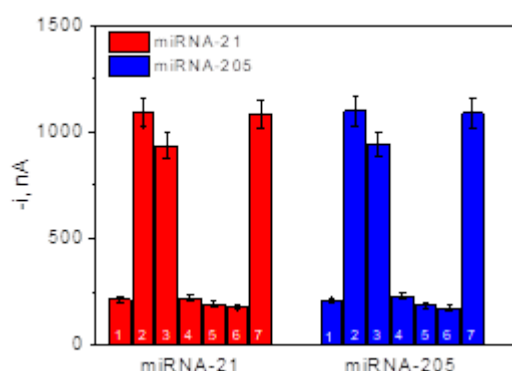


Figura 107: Evaluación de la selectividad de la bioplataforma desarrollada para la determinación dual de miRNAs. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (1) y en presencia de 5.0 nM de: miRNA diana sintético correspondiente (2), miRNA con una base desapareada (1-m) (3), secuencias de miRNA no complementarias (NC) (NC₁: miRNA-205 ó miRNA-21 (4); NC₂: miRNA-192 (5)), y mezclas de NC₁ y NC₂ en ausencia (6) y en presencia de cada miRNA diana correspondiente (7). E_{app} = -0.2 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

4.2.1.1.5. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA_t

La información que proporciona el análisis simultáneo de varios miRNAs, tanto en muestras clínicas sólidas como en biopsias líquidas, resulta de gran utilidad médica para mejorar la fiabilidad del diagnóstico, pronóstico, estratificación y tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

En el caso particular de las neoplasias mamarias, el valor diagnóstico y pronóstico del oncogén miRNA-21, altamente desregulado, promoviendo el crecimiento de la masa tumoral, invasión y metástasis [Jinling, 2017], [Hamam, 2017], y del supresor tumoral específico miRNA-205, caracterizado por presentar bajos niveles de expresión en los subtipos moleculares con peor pronóstico, catalogado de acuerdo a la expresión de los receptores hormonales ER, PR y HER-2, como triples negativos (TNBC) [Singh, 2013], [Piasecka, 2018], se ha demostrado recientemente en numerosos estudios de investigación. Por tanto, es de esperar que la determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205, además de informar acerca de la presencia de la enfermedad, permita identificar de manera inequívoca el subtipo molecular de la misma, discriminando entre grupos clasificados como TNBC de los que presentan un pronóstico más favorable.

Así, la aplicabilidad real de la bioplataforma se demostró analizando miRNA-21 y miRNA-205 en extractos de RNA_t de células epiteliales normales (MCF-10A) y de cáncer de mama con distintos niveles de expresión de los receptores hormonales ER, PR y HER-2, incluyendo células MCF-7 (ER⁺/PR⁺/HER-2⁻), SK-BR-3 (ER⁻/PR⁻/HER-2⁺) y MDA-MB-231 (ER⁻/PR⁻/HER-2⁻), así como en extractos de RNA_t de tejidos frescos de mama T y NT adyacentes pareados.

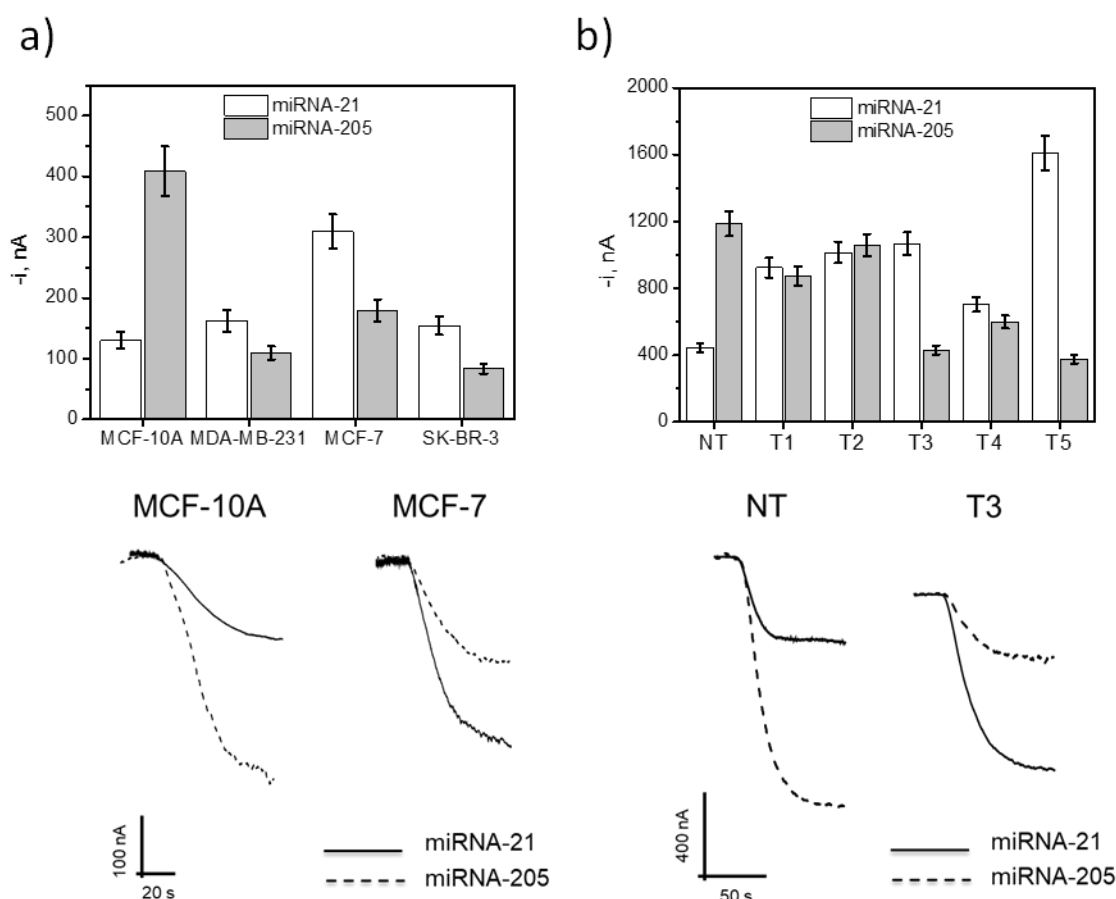


Figura 108: Determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 en muestras de RNA_t extraído de líneas celulares (a) y de tejidos frescos T y NT (b) de pacientes diagnosticadas con cáncer mama empleando la plataforma biosensora dual desarrollada. Se muestran también ejemplos de los registros amperométricos reales obtenidos para cada tipo de muestra. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados obtenidos en las líneas celulares ensayadas (**Figura 108a**) reflejan la hiperexpresión de miRNA-21 y la expresión reducida para miRNA-205 en todas las células de cáncer MDA-MB-231, MCF-7 y SK-BR-3, en comparación con la expresión observada para cada miRNA en células epiteliales normales MCF-10A, resultados que están nuevamente de acuerdo con el papel oncogénico y de supresor tumoral que desempeñan el miRNA-21 y el miRNA-205, respectivamente, en este tipo de neoplasia.

Es importante destacar que los niveles de expresión obtenidos para el miRNA-205 en células MDA-MB-231 y SK-BR-3 resultaron claramente inferiores a los de las células MCF-7, lo que confirmó la elevada especificidad de este supresor tumoral para discriminar entre los

estados de los receptores hormonales, mostrando unos mayores niveles de expresión en los subtipos ER⁺/PR⁺ [Mattie, 2006].

Por otro lado, la comparación de las respuestas obtenidas para cada miRNA en las muestras de RNA_t de tejidos T y NT de mama (**Figura 108b**), indicaron, de acuerdo con los resultados esperables, un mayor nivel de expresión para el miRNA con carácter oncogénico y una expresión más reducida para el supresor tumoral en todas las muestras T ensayadas, en comparación con los encontrados en las muestras clasificadas como NT (de la que se muestra solo un ejemplo representativo por no observarse diferencias significativas en las respuestas obtenidas para las distintas muestras ensayadas de esta categoría). Las relaciones de expresión T/NT obtenidas para miRNA-21, comprendidas en un rango entre 1.557–2.449, estaban de acuerdo con los resultados obtenidos previamente con las diferentes plataformas desarrolladas en esta Tesis Doctoral para la determinación individual de este oncomiR (Apdos.4.1.2.1.1.4, 4.1.2.1.2.4, 4.1.2.2.1.4, 4.1.2.2.2.4 y 4.1.2.3.4) y con los descritos por otros autores [Savad, 2012], [Xu, 2016].

La concordancia entre los resultados obtenidos con la plataforma dual propuesta y los reportados por otros autores, tanto en células como en tejidos, [Elgamal, 2013], [Singh, 2013], [Savad, 2012], [Xu, 2016] revelaron la excelente utilidad real de la metodología para la interrogación simultánea de miRNAs clínicamente relevantes en el diagnóstico y pronóstico de cáncer (o de otras enfermedades), de una manera rápida, precisa y reproducible.

Finalmente, y teniendo en cuenta que en numerosas ocasiones ocurren situaciones clínicas en las que la discriminación rápida y precisa de niveles de expresión de miRNAs en tejidos T y NT resulta esencial para la toma de decisiones por parte del personal especializado, se evaluó la posibilidad de llevar a cabo la detección de ambos biomarcadores en muestras de RNA_t de tejidos T y NT reduciendo el tiempo total de ensayo a 15 minutos, realizando los procesos de formación de los homohíbridos de b-anti-miRNA/miRNA, captura específica por las p19-MBs y marcaje enzimático con Estrep-HRP, durante etapas de incubación secuenciales de tan solo 5 minutos cada una.

Los resultados obtenidos (**Figura 109**), de gran relevancia teniendo en cuenta las condiciones tan forzadas en las que se desarrolló la metodología, demostraron la posibilidad de llevar a cabo la detección de ambos miRNAs en las muestras seleccionadas de una manera precisa, ya que, a pesar de la esperada disminución de la sensibilidad como consecuencia de

la drástica disminución del tiempo de incubación de cada una de las etapas involucradas en la estrategia desarrollada, se obtuvieron las diferencias esperables en la expresión de cada biomarcador en las muestras analizadas.

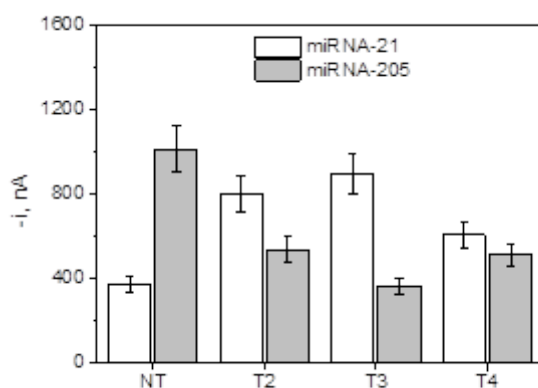


Figura 109: Determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 en muestras de RNA_t extraído de tejidos frescos T y NT de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama empleando la bioplataforma dual desarrollada reduciendo el tiempo total de ensayo a 15 minutos. $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.2.1.2. BIOSENSORES BASADOS EN ANTICUERPOS SELECTIVOS

Los resultados que se presentan en este apartado son los que se describen en la última parte del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Fast electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody-functionalized magnetic microcarriers. ACS Sensors 1 (2016) 896–903*, cuyo documento se presenta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

Continuando con la detección múltiple de biomarcadores del mismo nivel molecular empleando plataformas electroquímicas, también se evaluó esta posibilidad aprovechando el conocimiento adquirido durante la implementación de plataformas para la determinación individual de miRNAs empleando como bio-receptores de captura anticuerpos comerciales específicos a híbridos de DNA–RNA (Ab S9.6) (Apdo. 4.1.2.2.1).

El fundamento de la metodología desarrollada, representado en la **Figura 110**, consistió en la obtención de los heterohíbridos b-DNA-miRNA mediante hibridación homogénea entre el miRNA de interés y su sonda complementaria de DNA sintética y biotinilada en el extremo 3' (b-anti-DNA), seguida de la captura de los heterohíbridos formados en disolución mediante su incubación con Ab S9.6-MBs. Finalmente, los conjugados b-DNA-

miRNA-Ab S9.6-MBs correspondientes a miRNA-21 y miRNA-205, respectivamente, se marcaron enzimáticamente con Estrep-HRP. Los lotes de MBs modificados para cada uno de los miRNAs diana se capturaron magnéticamente en cada uno de los electrodos de trabajo de un SPdCE para llevar a cabo el proceso de transducción amperométrica de ambos biomarcadores, en un único experimento.

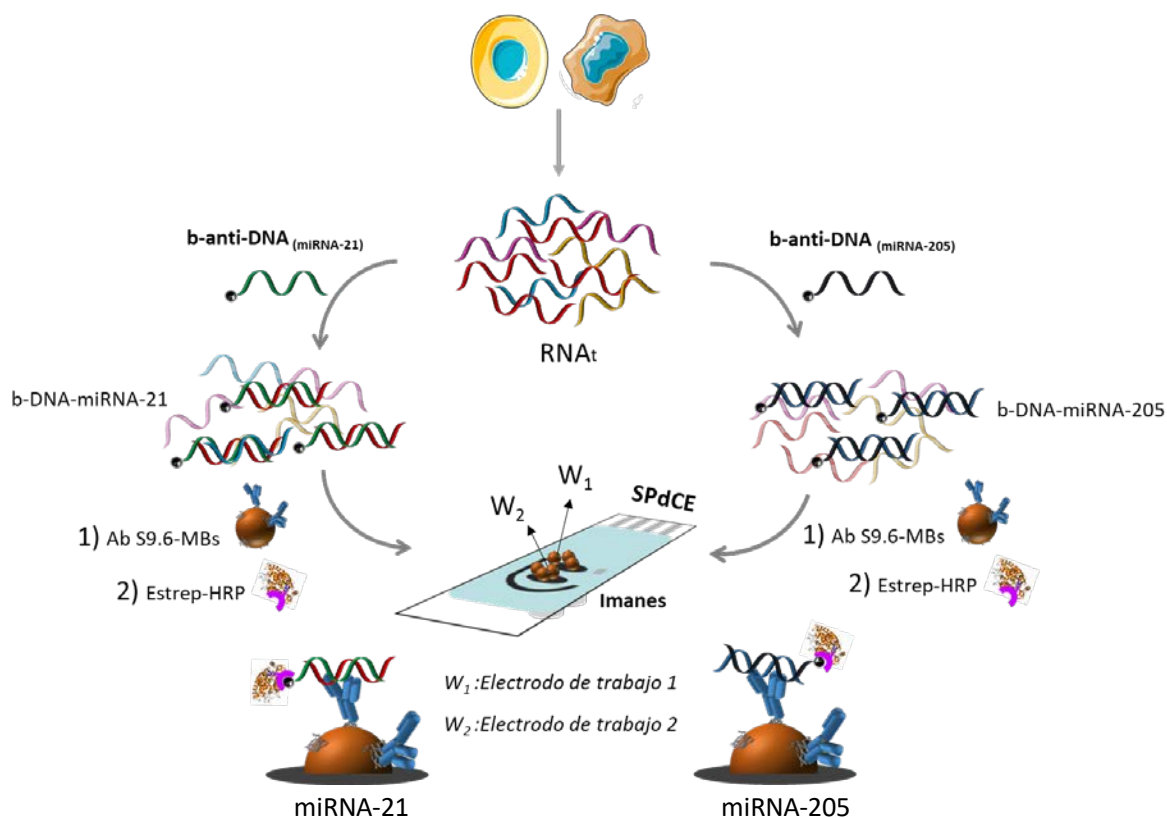


Figura 110: Esquema del fundamento de la metodología empleada para la determinación simultánea de miRNA-21 y miRNA-205 tras la captura específica de los heterohíbridos de b-DNA-miRNA correspondientes a cada miRNA, previamente formados en disolución homogénea, empleando Ab S9.6-MBs (1) y el marcaje enzimático de los heterohíbridos capturados con Estrep-HRP (2) para llevar a cabo la detección amperométrica.

En este caso, para el desarrollo de la bioplataforma dual también se emplearon las variables experimentales optimizadas en la metodología para la determinación individual resumidas en la **Tabla 27** y discutidas en el Apdo. 4.1.2.2.1.1.

Tampoco se evaluó para esta bioplataforma en particular su comportamiento analítico para la determinación de estándares de ambos miRNAs, asumiendo que ofrecería prestaciones similares a la bioplataforma desarrollada para la determinación individual

considerando la pérdida de sensibilidad esperable por la disminución del área superficial activa de los electrodos de trabajo del SPdCE.

4.2.1.2.1. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE RNA_t

La aplicabilidad práctica de esta bioplataforma se evaluó analizando miRNA-21 y miRNA-205 en extractos crudos de RNA_t de células de cáncer de mama (MCF-7) y células epiteliales normales (MCF-10A).

Los registros amperométricos obtenidos sobre SPdCEs para la determinación de ambos miRNAs sintéticos, preparados en disolución reguladora de PBS (pH 7.5) y en 500 ng de los correspondientes extractos de RNA_t, se muestran en la **Figura 111**.

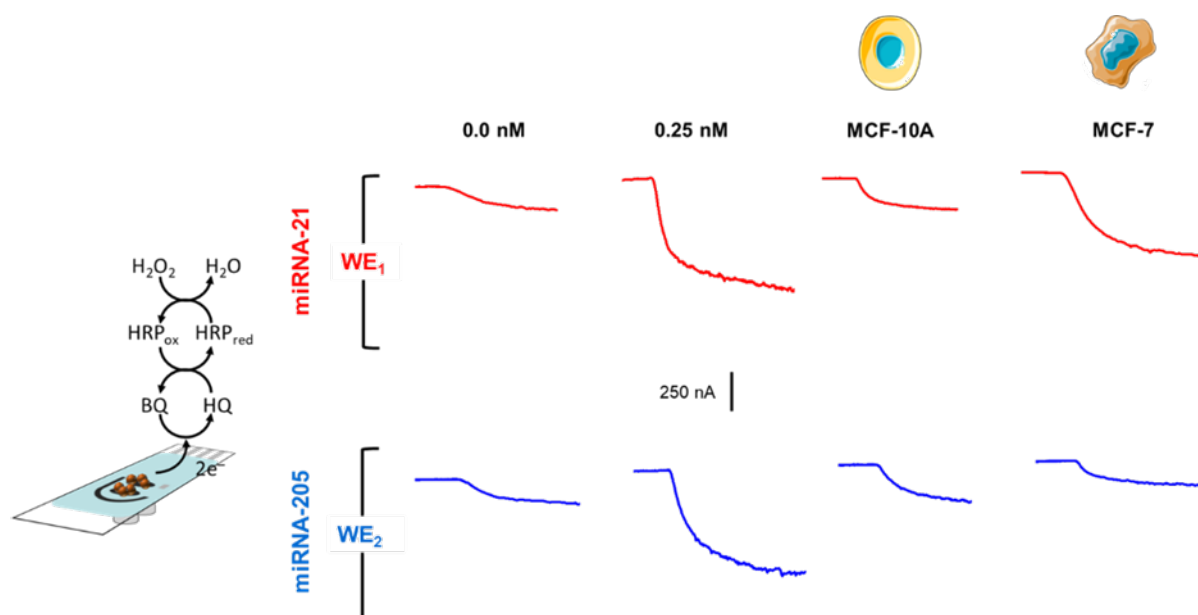


Figura 111: Registros amperométricos obtenidos con la bioplataforma dual de miRNAs, para 0.0 y 0.25 nM de miRNA-21 y miRNA-205 sintéticos, respectivamente, y en presencia de 500 ng de RNA_t extraído de células epiteliales normales MCF-10A y células de cáncer de mama MCF-7.

Los amperogramas obtenidos, de acuerdo con los resultados presentados a lo largo de esta Tesis Doctoral en relación a la determinación de miRNAs en este tipo de muestras clínicas, confirmaron el nivel de expresión superior del oncomiRNA e inferior del supresor tumoral en células cancerígenas (MCF-7) en comparación con los niveles observados en células epiteliales (MCF-10A) y la utilidad práctica de esta bioplataforma para la determinación dual de miRNAs.

4.2.2. PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISTINTA NATURALEZA: PROTEÍNA INTERLEUCINA-8 (IL-8) Y SU RNA MENSAJERO ASOCIADO (mRNA)

Se discuten en este apartado los resultados del artículo *Torrente-Rodríguez et al. Electrochemical bioplatforms for the simultaneous determination of interleukin (IL)-8 mRNA and IL-8 protein oral cancer biomarkers in raw saliva. Biosensors & Bioelectronics 77 (2016) 543–548*, cuyo documento se presenta como anexo al final de esta Tesis Doctoral.

El cáncer oral, que afecta a los labios, lengua, glándulas salivales, orofaringe y otras regiones orales, es uno de los tipos de neoplasia de mayor incidencia en los países desarrollados [Gupta, 2016].

La proteína interleucina-8 (IL-8) y su RNA mensajero asociado (IL-8 mRNA) se han identificado recientemente como biomarcadores salivares de gran potencial para diagnóstico y pronóstico de este tipo de neoplasia [Sahibzada, 2017], [Michailidou, 2016], presentando niveles de expresión significativamente superiores en muestras de saliva de individuos diagnosticados con cáncer en comparación con los encontrados en individuos sanos.

La inmensa información fisiológica contenida en la saliva ha permitido que este fluido mínimamente invasivo, disponible en cantidades inagotables y de sencilla y cómoda recolección, sea considerado un espécimen de diagnóstico de gran utilidad capaz de proporcionar, a través del análisis de los biomarcadores que contiene, incluyendo hormonas, citoquinas, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos [Khan, 2017], entre otros, una instantánea precisa y en tiempo real del estado patológico del paciente [Campuzano, 2017^f], [Aro, 2017].

De acuerdo con estos antecedentes, se ha desarrollado una bioplataforma amperométrica para la determinación simultánea de proteína IL-8 e IL-8-mRNA directamente en muestras de saliva cruda, basada en el empleo de MBs comerciales, anticuerpos específicos a IL-8, secuencias de DNA de tipo horquilla complementarias a IL-8 mRNA, el conjugado enzimático Estrep-HRP y SPdCEs como transductores electroquímicos (Figura 112).

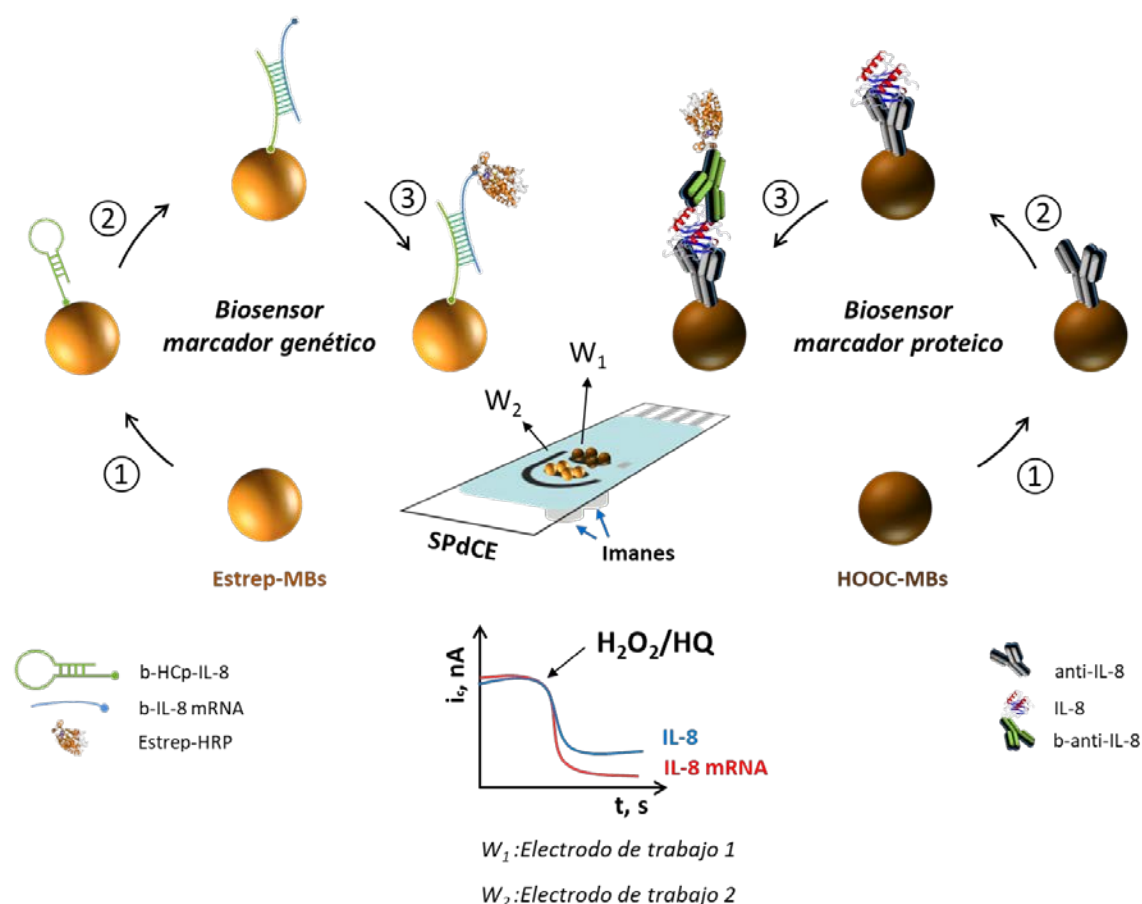


Figura 112: Etapas involucradas en la modificación simultánea de MBs comerciales (Estrep-MBs y HOOC-MBs) en las que se basa la plataforma electroquímica dual para la determinación de proteína IL-8 e IL-8 mRNA que incluyen: inmovilización efectiva del receptor de afinidad empleado (1), captura selectiva de cada biomarcador diana (2) y reconocimiento y marcaje enzimático (3) para llevar a cabo la detección amperométrica.

Mientras que para la determinación del biomarcador proteico (IL-8) se empleó una estrategia de inmunoensayo tipo sándwich implementada sobre HOOC-MBs basada en dos anticuerpos específicos, uno de ellos biotinilado que actúa como anticuerpo de detección (b-anti-IL-8), en el caso del biomarcador genético (IL-8 mRNA), la metodología implicaba la hibridación heterogénea del IL-8 mRNA sintético biotinilado en el extremo 5' (b-IL-8 mRNA) sobre Estrep-MBs previamente modificadas con una sonda sintética y biotinilada (en 5') de DNA de tipo horquilla (b-HCp-IL-8). Para ambos biomarcadores, el marcaje enzimático (del b-anti-IL-8 o del b-IL-8 mRNA sintético) previo a la transducción amperométrica se realizaba con Estrep-HRP.

4.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Como paso previo al traslado de cada una de las estrategias sobre la superficie de SPdCEs para la determinación simultánea de ambos biomarcadores, se optimizaron individualmente las variables experimentales que influían de manera directa en el funcionamiento de cada metodología tomando como criterio de selección la comparación entre las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (B) y en presencia (S) de 4000 pg mL⁻¹ de estándares de proteína IL-8 y 2.5 nM (o 500 nM) de b-IL-8 mRNA sintético, respectivamente, seleccionando como valor óptimo aquel que proporcionaba la mayor relación S/B.

A continuación, se presentan, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en la evaluación de la concentración de los bio-receptores de captura y detección empleados para la detección individual de proteína IL-8 (anti-IL-8 y b-anti-IL-8) e IL-8 mRNA (b-HCp-IL-8) (**Figura 113** y **114**, respectivamente), así como el estudio del número de etapas de la metodología para la detección simultánea de ambas biomoléculas en muestras de saliva cruda (**Figura 115**).

- Optimización de la concentración de anti-IL-8 y b-anti-IL-8

La influencia de la concentración de los dos anticuerpos involucrados en la determinación de la proteína IL-8 se evaluó empleando diluciones de anti-IL-8 y b-anti-IL-8 en rangos comprendidos entre 1:30–1:10 y 1:50–1:5, respectivamente.

Tal y como muestra la **Figura 113**, la mayor relación S/B se obtuvo empleando diluciones 1:20 y 1:10 de anti-IL-8 y b-anti-IL-8, respectivamente, por lo que se seleccionaron como óptimas para estudios posteriores. Para factores de dilución inferiores, las relaciones S/B permanecían constantes o disminuían como consecuencia de la estabilización de ambos tipos de señales (**Figura 113a**) o de un aumento más significativo de las respuestas inespecíficas (B) en comparación con las específicas (S) (**Figura 113b**).

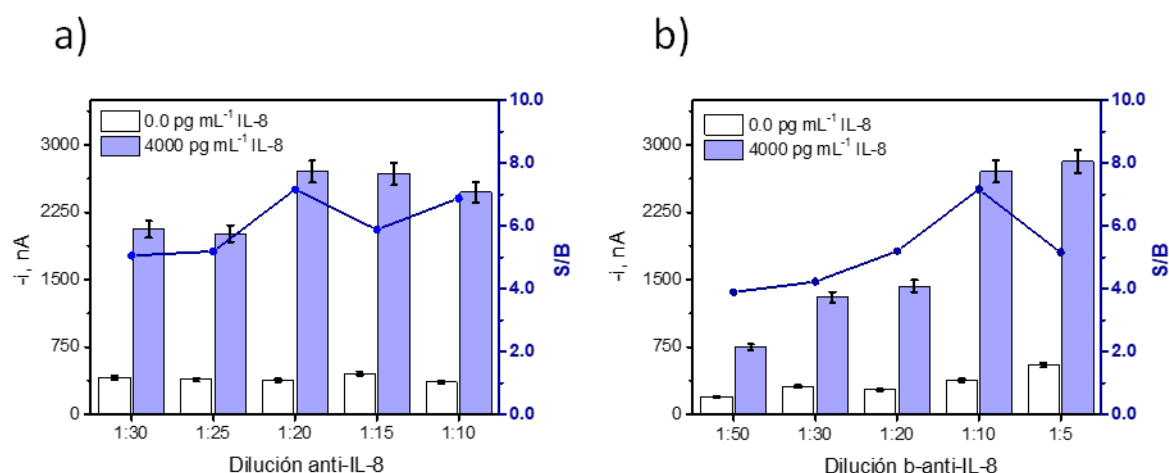


Figura 113: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras azules, S) de 4000 pg mL⁻¹ de estándar de proteína IL-8 en función del factor de dilución de anti-IL-8 (a) y de b-anti-IL-8 (b). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas.

- Optimización de la concentración de b-HCp-IL-8

La influencia de la concentración de b-HCp-IL-8 en la respuesta del biosensor de IL-8 mRNA (**Figura 114**) se estudió variando la concentración que se inmovilizaba sobre las Estrep-MBs, en el intervalo comprendido entre 0.0 y 5.0 μ M, en presencia de 500 nM de b-IL-8 mRNA sintético. Es importante destacar que estos estudios se realizaron a una concentración muy superior de b-IL-8 mRNA sintético con el fin de asegurar que la cantidad de b-HCp-IL-8 nunca iba a resultar limitante para la determinación de IL-8 mRNA, independientemente de su concentración en la muestra analizada. Como puede observarse, los valores de la intensidad de corriente aumentaban proporcionalmente con la concentración de b-HCp-IL-8 hasta un valor de 0.5 μ M, a partir del cual permanecían constantes, confirmando el recubrimiento completo de las MBs con el elemento de reconocimiento específico.

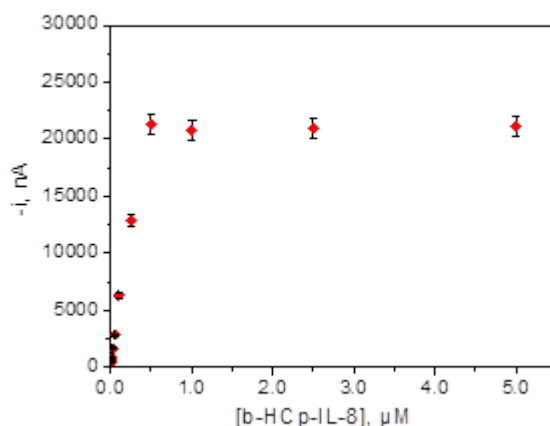


Figura 114: Respuestas amperométricas obtenidas con el biosensor desarrollado en función de la concentración de b-HCp-IL-8 inmovilizada sobre las Estrep-MBs, en presencia de 500 nM de b-IL-8 mRNA sintético. $E_{\text{app}} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

El resto de las variables experimentales evaluadas de manera individual para cada biomarcador, siguiendo los procedimientos experimentales correspondientes en cada caso, junto con los rangos evaluados y los valores seleccionados como óptimos para cada variable estudiada, se resumen en la **Tabla 34**.

Tabla 34: Optimización de las distintas variables experimentales que afectan a la determinación individual de proteína IL-8 e IL-8 mRNA.

<i>Biomarcador</i>	<i>Variable</i>	<i>Rango evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>IL-8</i>	<i>Dilución anti-IL-8</i>	<i>1:30–1:10</i>	<i>1:20</i>
	<i>HOOC-MBs, μg (μL)</i>	<i>20–60 (2.0–6.0)</i>	<i>40 (4.0)</i>
	<i>Dilución b-anti-IL-8</i>	<i>1:50–1:5</i>	<i>1:10</i>
	<i>Dilución Estrep-HRP</i>	<i>1:2000–1:500</i>	<i>1:1000</i>
	<i>Número de etapas</i>	<i>1–3</i>	<i>1</i>
	<i>$t_{\text{incubación (1 etapa)}}$, min</i>	<i>15–90</i>	<i>45</i>
<i>b-IL-8 mRNA</i>	<i>[b-HCp-IL-8], μM</i>	<i>0.0–5.0</i>	<i>0.5</i>
	<i>Estrep-MBs, μg (μL)</i>	<i>30–100 (3.0–10.0)</i>	<i>30 (3.0)</i>
	<i>Dilución Estrep-HRP</i>	<i>1:10000–1:1000</i>	<i>1:1000</i>
	<i>Número de etapas</i>	<i>1–2</i>	<i>1</i>
	<i>$t_{\text{incubación (1 etapa)}}$, min</i>	<i>15–90</i>	<i>15</i>
	<i>Volumen incubación, μL</i>	<i>25–75</i>	<i>25</i>

- Evaluación del número de etapas para la determinación simultánea de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA en muestras de saliva cruda

Con vistas a simplificar y unificar los protocolos experimentales involucrados en la determinación individual para la fabricación de la plataforma para la determinación dual de IL-8 y b-IL-8 mRNA, en muestras de saliva cruda sin diluir, se evaluaron los siguientes protocolos: 1) una etapa de incubación de las anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MBs con mezclas de saliva cruda suplementadas con las concentraciones apropiadas de IL-8, b-IL-8 mRNA y los respectivos marcadores enzimáticos (b-anti-IL-8 y Estrep-HRP), y 2) dos (o tres para la proteína IL-8) etapas secuenciales de incubación de las anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MBs con mezclas de saliva cruda conteniendo ambos biomarcadores, seguidas de la incubación de las IL-8-anti-IL-8-MBs, primero con b-anti-IL-8 y de las b-anti-IL-8-IL-8-anti-IL-8-MBs con Estrep-HRP, y de las b-IL-8 mRNA-b-HCp-IL-8-MBs con Estrep-HRP, respectivamente.

Los resultados obtenidos, representados en la **Figura 115**, demostraron que solo era posible discriminar claramente la presencia de cada tipo de biomarcador cuando se empleaba el protocolo en 2 (o 3 para la proteína IL-8) etapas secuenciales, por ser las condiciones que ofrecían menor impedimento estérico en los procesos de reconocimiento y marcaje enzimático de cada biomarcador diana.

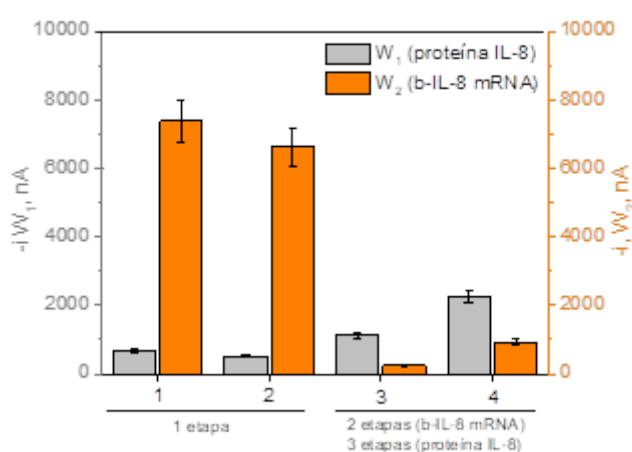


Figura 115: Efecto del número de etapas de la metodología desarrollada para la determinación simultánea de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA en muestras de saliva cruda sin diluir. Respuestas amperométricas obtenidas empleando los protocolos indicados en 1 o 2 (para b-IL-8 mRNA) y 3 (para proteína IL-8) etapas tras la incubación de las anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MBs con mezclas conteniendo 0.0 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 0.0 nM de b-IL-8 mRNA (barras 1 y 3), y 600 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 2.5 nM de b-IL-8 mRNA (barras 2 y 4). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3).

4.2.2.2. EVALUACIÓN DE REACTIVIDAD CRUZADA EN LA DETECCIÓN DE AMBOS BIOMARCADORES

Con el objetivo de demostrar la ausencia de reactividad cruzada en la bioplataforma desarrollada, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas tras la incubación de lotes diferentes de anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MBs con disoluciones mezcla que contenían distintas concentraciones de estándares de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA, preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5).

Los resultados obtenidos (**Figura 116**), confirmaron tanto la viabilidad del proceso de determinación simultánea de IL-8 y b-IL-8 mRNA en ausencia de reactividad cruzada entre ambos electrodos de trabajo, como la selectividad de los bio-receptores empleados para la captura y el marcaje específicos de su biomarcador diana.

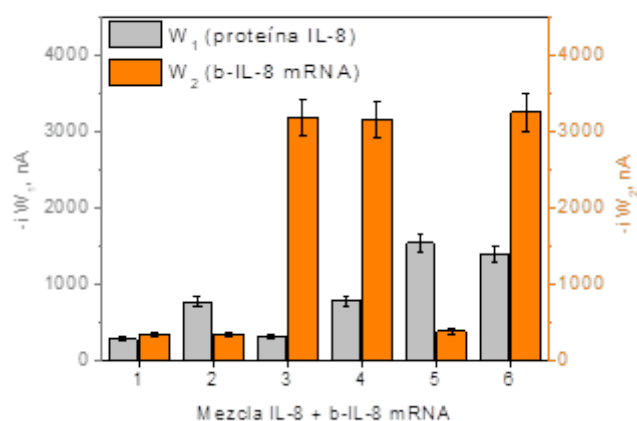


Figura 116: Respuestas amperométricas obtenidas empleando la bioplataforma dual desarrollada para la determinación de mezclas preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) que contenían las siguientes concentraciones de estándar de proteína IL-8 (en pg mL^{-1}) y b-IL-8 mRNA sintético (en nM), respectivamente: 0.0 y 0.0 (1); 600 y 0.0 (2); 0.0 y 2.5 (3); 600 y 2.5 (4); 2500 y 0.0 (5) y 2500 y 2.5 (6). $E_{\text{app}} = -0.2 \text{ V}$ (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

4.2.2.3. CURVAS DE CALIBRADO, CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y ESTABILIDAD

Tras la selección de las variables experimentales se evaluaron las características analíticas, la reproducibilidad y la estabilidad de las bioplataformas desarrolladas para la determinación dual de estándares de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA sintético.

La reproducibilidad en los procesos de modificación de MBs, captura magnética sobre la superficie de cada uno de los electrodos de trabajo de los que dispone el SPdCE y de detección amperométrica, se evaluaron comparando las respuestas amperométricas obtenidas mediante diferentes plataformas para disoluciones mezclas que contenían 600 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 2.5 nM de b-IL-8 mRNA, respectivamente, preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5), y en muestras de saliva cruda sin diluir.

Los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos con 5 bioplataformas distintas para proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA, en PBST (pH 7.5) (8.3 y 7.7 %, respectivamente) y en muestras de saliva sin diluir (8.4 y 8.3 %, respectivamente), confirmaron la fiabilidad de los procesos asociados con la modificación de las MBs, su captura magnética y la transducción amperométrica.

Por otro lado, el comportamiento analítico del biosensor dual se evaluó construyendo curvas de calibrado (preparadas en PBST (pH 7.5)) (**Figura 117a y 117b**) y en muestras de saliva cruda sin diluir (**Figura 117c y 117d**), para disoluciones mezcla conteniendo concentraciones variables de cada una de las dianas de interés.

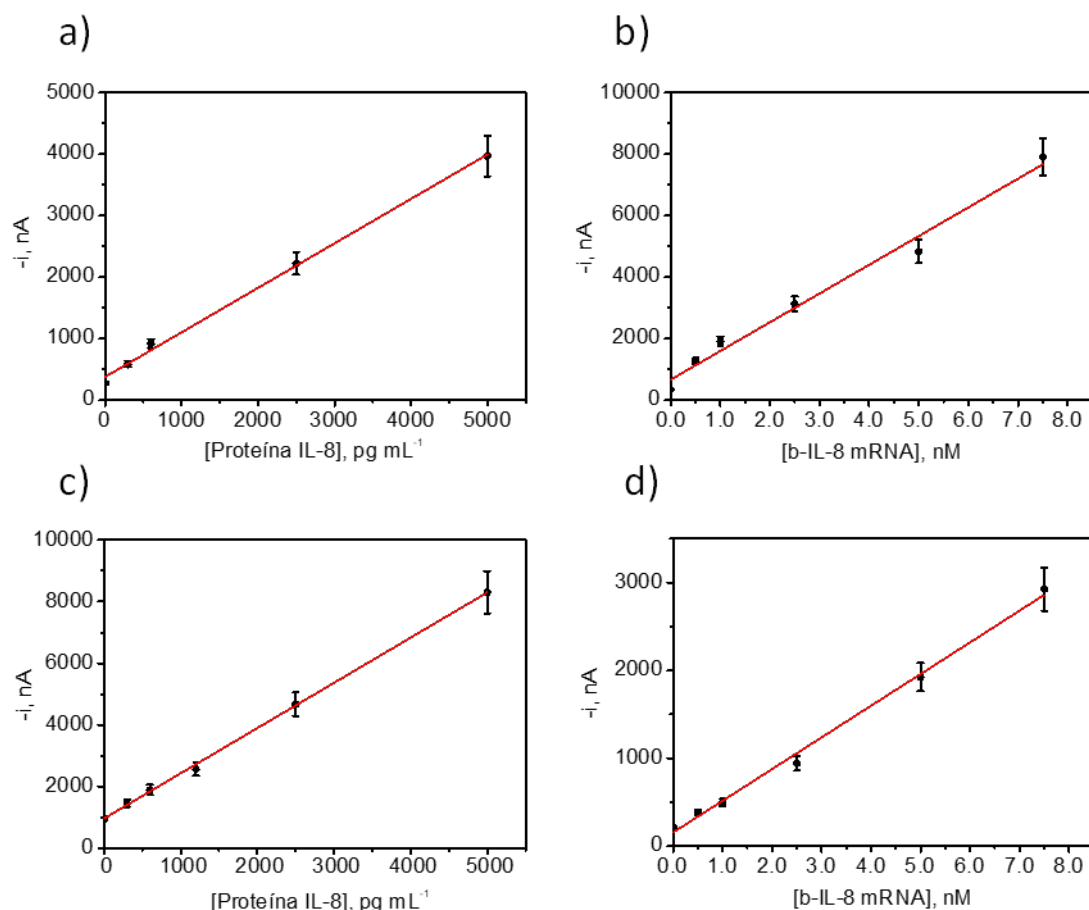


Figura 117: Curvas de calibrado obtenidas con las bioplataformas duales para disoluciones mezcla que contienen concentraciones crecientes de proteína IL-8 (a y c) y b-IL-8 mRNA (b y d) preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) (a y b) o en muestras de saliva cruda sin diluir (c y d). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n=3$).

Las características analíticas obtenidas con la plataforma dual para la determinación simultánea de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) y en muestras de saliva cruda sin diluir se resumen en la **Tabla 35**. Resulta destacable la sensibilidad aceptable obtenida para el biomarcador genético, teniendo en cuenta que la metodología no emplea etapas de amplificación del ácido nucleico diana, y la elevada sensibilidad que resulta para la determinación de proteína IL-8, ofreciendo un LD 23 veces inferior al valor de corte establecido para el contenido de este biomarcador en saliva (600 pg mL⁻¹) que permite discriminar entre pacientes con cáncer oral e individuos sanos [John, 2004].

Tabla 35: Características analíticas obtenidas con las bioplataformas duales desarrolladas para la determinación simultánea de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) y en muestras de saliva sin procesar ni diluir.

<i>Característica</i>	<i>PBST (pH 7.5)</i>		<i>Saliva cruda</i>	
	<i>Proteína IL-8</i>	<i>b-IL-8-mRNA</i>	<i>Proteína IL-8</i>	<i>b-IL-8-mRNA</i>
<i>DR</i>	(87.9–5000) pg mL ⁻¹	(0.32–7.5) nM	(241.3–5000) pg mL ⁻¹	(0.69–7.5) nM
<i>r</i>	0.9975	0.9956	0.9992	0.9955
<i>Pendiente</i>	(0.72 ± 0.02) nA pg ⁻¹ mL	(934 ± 56) nA nM ⁻¹	(1.47 ± 0.02) nA pg ⁻¹ mL	(361 ± 12) nA nM ⁻¹
<i>LD</i>	26.4 pg mL ⁻¹	0.10 nM	72.4 pg mL ⁻¹	0.21 nM
<i>LC</i>	87.9 pg mL ⁻¹	0.32	241.3 pg mL ⁻¹	0.69 nM
<i>RSD (n=5)</i>	8.3	7.8	8.4	8.4

Por otro lado, la evaluación de la estabilidad con el tiempo de cada lote de MBs modificadas con los receptores de captura correspondientes (anti-IL-8-MBs y b-HCp-IL-8-MB) y almacenadas a 4 °C en disolución reguladora de PBS filtrada (pH 7.5), demostró que las plataformas preparadas a partir de ellas proporcionaban respuestas para disoluciones mezcla que contenían 600 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 2.5 nM de b-IL-8 mRNA, que se mantenían dentro de los límites de control establecidos para cada biomarcador durante 30 y 11 días, respectivamente (resultados no mostrados).

4.2.2.4. EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LA METODOLOGÍA

La determinación fiable de dos o más biomarcadores que coexisten en una muestra dada requiere que las estrategias diseñadas para tal fin proporcionen respuestas específicas únicamente en presencia de los biomarcadores diana.

Así, la selectividad de la plataforma desarrollada se evaluó frente a secuencias sintéticas no complementarias (NC) y complementarias a la sonda de DNA empleada como elemento de captura (b-HCp-IL-8) con una base desapareada en posición central (b-IL-8 mRNA 1-m), así como frente a otras proteínas circulantes en saliva. Para ello, se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de los distintos interferentes ensayados, para concentraciones de 2500 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y de 5.0 nM de b-IL-8 mRNA, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 118**.

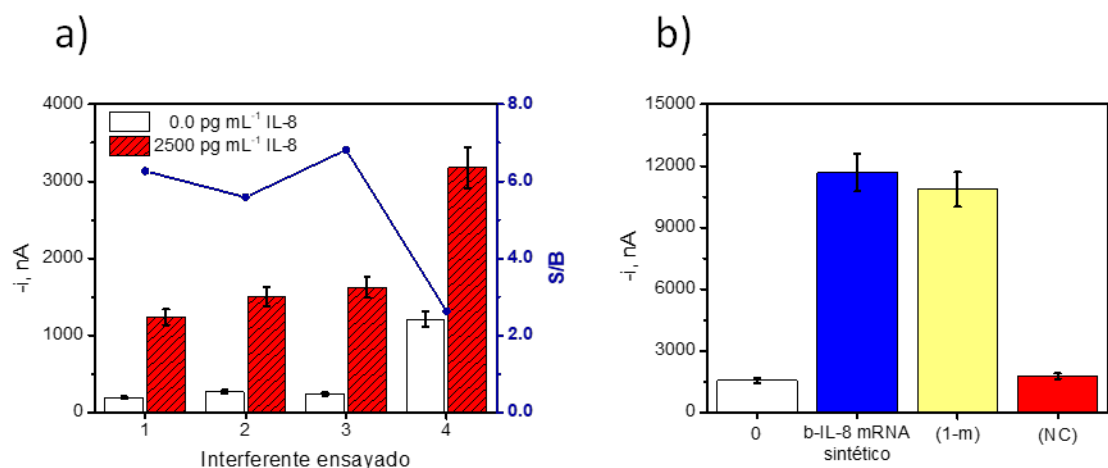


Figura 118: Evaluación de la selectividad de la plataforma dual desarrollada. Respuestas amperométricas obtenidas para la determinación de la proteína IL-8 (a) en ausencia (barras blancas, B) y en presencia (barras rojas rayadas, S) de 2500 pg mL⁻¹ de IL-8 preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) sin suplementar (1) y suplementada con 2500 pg mL⁻¹ de IL-6 (2), 44.0 μg mL⁻¹ de lisozima (3) y 10.0 μg mL⁻¹ de lactoperoxidasa (LPO) (4), y para la determinación de b-IL-8 mRNA (b) en ausencia (0) y en presencia de 5.0 nM de las siguientes secuencias sintéticas: b-IL-8 mRNA, b-IL-8 mRNA con una base desapareada en posición central (1-m), y secuencias de mRNA biotiniladas no complementarias (NC). $E_{app} = -0.2$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n=3). Se muestra también la relación (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas para el biomarcador proteico.

Como puede observarse, solo la presencia de LPO suponía una interferencia en la determinación de la proteína IL-8 (**Figura 118a**) debido a su adsorción inespecífica, a su actividad peroxidasa y al sistema de reacciones implicado en la transducción amperométrica [Conzuelo, 2014], [Montiel, 2015^a]. Aunque como se demostrará, esta interferencia no supone un problema en la determinación de la proteína diana en saliva, en caso necesario se podría eliminar de forma sencilla y rápida por un simple tratamiento térmico (1 minuto a 80 °C) [Conzuelo, 2014] o realizando el marcaje enzimático con AP en vez de HRP empleando Estrep-AP en lugar de Estrep-HRP.

Los estudios de selectividad obtenidos para las secuencias de DNA sintéticas (**Figura 118b**) confirmaron una selectividad total hacia las secuencias NC y deficiente frente a secuencias 1-m en posición central. En este punto es importante destacar que es muy poco probable encontrar de manera simultánea y al mismo nivel de concentración ambos tipos de secuencias (IL-8 mRNA y 1-m) [Labib, 2013] por lo que, tal y como se demuestra a

continuación, este resultado tampoco supone un problema desde el punto de vista de la aplicabilidad real de la metodología.

4.2.2.5. APLICACIÓN AL ANÁLISIS EN SALIVA

La plataforma dual desarrollada se aplicó a la determinación del nivel endógeno de la proteína IL-8 en muestras de saliva sin procesar de individuos sanos, y a la determinación simultánea de IL-8 y b-IL-8 mRNA en muestras de saliva cruda de individuos sanos, suplementadas con 600 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 2.5 nM de b-IL-8 mRNA.

Es necesario resaltar que, teniendo en cuenta la metodología desarrollada, la determinación del contenido endógeno de IL-8 mRNA de una muestra requeriría un proceso previo de lisis para liberar el mRNA objetivo de otras macromoléculas a las que se encuentra asociado en las muestras de saliva [Wei, 2008], [Wei, 2009], y una etapa de biotinilación previa.

Las diferencias observadas previamente en los valores de las pendientes obtenidas para la determinación de las mezclas de ambos biomarcadores preparadas en disolución reguladora de PBST (pH 7.5) y en muestras de saliva cruda sin diluir (**Figura 117a y 117c**, y **Tabla 35**) ponían claramente de manifiesto la existencia de efecto matriz para la determinación de la proteína IL-8 en la muestra seleccionada, por lo que las determinaciones del contenido endógeno de proteína IL-8 en las mismas se realizaron aplicando el método de adiciones estándar, construyendo curvas de calibrado en cada muestra de saliva a analizar suplementándolas con concentraciones crecientes de estándar de proteína IL-8 en el rango comprendido entre 300 y 600 pg mL⁻¹.

Los resultados del nivel endógeno de proteína IL-8 en las 7 muestras de saliva analizadas, obtenidos con las bioplataformas desarrolladas y mediante un kit ELISA comercial empleando los mismos inmunoreactivos, se resumen en la **Tabla 36**. Como puede observarse, en todos los casos resultaron contenidos inferiores al valor de corte establecido (600 pg mL⁻¹), lo que está de acuerdo con que todas las muestras analizadas fueran de individuos sanos.

Tabla 36: Determinación del contenido endógeno de proteína IL-8 en muestras de saliva cruda sin diluir de 7 voluntarios sanos empleando el biosensor desarrollado y comparación de los resultados obtenidos con un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos.

Voluntario	Plataforma dual biosensora		Método ELISA espectrofotométrico	
	IL-8, pg mL ⁻¹	RSD (n=3)	IL-8, pg mL ⁻¹	RSD (n=3)
1	(320 ± 36)	4.5	(306 ± 33)	5.0
2	(328 ± 26)	3.2	(339 ± 55)	6.6
3	(352 ± 45)	5.2	(336 ± 44)	5.2
4	(314 ± 34)	4.3	(330 ± 65)	7.9
5	(363 ± 10)	1.1	(370 ± 33)	3.6
6	(323 ± 28)	3.5	(319 ± 63)	8.0
7	(264 ± 43)	6.6	(245 ± 46)	7.6

La comparación estadística entre los resultados proporcionados por ambos métodos, y por tanto, la evaluación de la existencia de diferencias significativas entre ellos, se realizó a través de los criterios F de Fisher y t-Student.

Los valores experimentales para F (F_{calc}) y t-Student (t_{calc}), se calcularon de acuerdo con las expresiones:

$$F_{calc} = s_1^2 / s_2^2$$

$$t_{calc} = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

siendo $n_1 + n_2 - 2$ los grados de libertad.

La comparación estadística entre los valores obtenidos con el biosensor desarrollado y los proporcionados por el método ELISA, resumidos en la **Tabla 37**, demostraron la ausencia de diferencias significativas entre las desviaciones estándar ($F_{calc} < F_{tab}$) y entre los resultados obtenidos con ambos métodos ($t_{calc} < t_{tab}$), a un nivel de significación de 0.05, por lo que es posible concluir que la bioplataforma desarrollada puede emplearse como una herramienta

de análisis fiable para la discriminación precisa y no invasiva entre individuos sanos y pacientes con cáncer oral, en función de los niveles de expresión de la proteína IL-8, directamente en muestras de saliva sin pretratar ni diluir.

Tabla 37: Comparación estadística de los resultados proporcionados por el biosensor amperométrico y el método ELISA según los criterios F de Fisher y t-Student.

<i>Individuo</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>t_{calc}</i>	<i>t_{tab}</i>
1	0.89		0.800	
2	0.22		0.531	
3	1.09		0.792	
4	0.27	19	0.641	2.776
5	0.09		0.622	
6	0.02		0.215	
7	0.19		1.496	

Es importante destacar que, aunque la saliva es un fluido biológico caracterizado por su gran heterogeneidad, no se observaron diferencias significativas entre los valores de las pendientes de los calibrados preparados en muestras de saliva cruda obtenidas de 10 voluntarios diferentes. Estas observaciones resultan especialmente relevantes ya que demuestran la posibilidad de construir un calibrado en una muestra de saliva representativa y emplearlo con carácter universal para la determinación de los niveles de proteína IL-8 en cualquier muestra de saliva.

Por otro lado, la determinación simultánea de proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA en muestras de saliva suplementadas con las concentraciones indicadas de ambos biomarcadores (600 pg mL⁻¹ de proteína IL-8 y 2.5 nM de b-IL-8 mRNA) se llevó a cabo interpolando las intensidades de corriente catódica obtenidas para cada muestra en las curvas de calibrado construidas para cada biomarcador en muestras de saliva (**Figura 117c y 117d**).

Los niveles de concentración media junto con los porcentajes de recuperación obtenidos para la proteína IL-8 y b-IL-8 mRNA resultaron de (615 ± 28) pg mL⁻¹ y (102 ± 5) %, y (2.3 ± 0.2) nM y (94 ± 7) %, respectivamente. Estos resultados confirmaron nuevamente la utilidad práctica del biosensor dual desarrollado para la determinación fiable y sencilla de

ambos biomarcadores directamente en muestras de saliva sin diluir, por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en calibrados construidos con estándares de ambos biomarcadores preparados en una muestra representativa de saliva.

Es importante destacar que los resultados obtenidos confirmaron que, a diferencia de las metodologías convencionales, las plataformas biosensoras electroquímicas desarrolladas permiten la determinación simultánea de biomarcadores de diferente nivel molecular directamente en muestras de saliva sin procesar ni diluir, empleando protocolos de ensayo sencillos y perfectamente compatibles.

Parte II.

Nanopartículas metálicas como enzimas
artificiales

4.3. SÍNTESIS Y EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE PRUSIA (PBNPs) Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES METÁLICOS COMO NANOZIMAS CON ACTIVIDAD PEROXIDASA INTRÍNSECA

Como es bien sabido, el fundamento básico de los biosensores electroquímicos de afinidad reside en la obtención de respuestas electroquímicas proporcionales a la concentración del analito diana presente en la muestra, mediante reacciones catalíticas en las que intervienen distintos tipos de enzimas dependiendo del sustrato empleado [Cho, 2018], generando productos con cargas eléctricas que pueden ser detectados en la superficie del transductor. Entre las enzimas más empleadas como generadores de señal en el desarrollo de biosensores de afinidad, destacan HRP y AP [Iqbal, 2012], pertenecientes a la familia de las oxidoreductasas e hidrolasas, respectivamente, actuando como catalizadores de procesos de transferencia de hidrógeno o electrones y de hidrólisis.

A pesar del gran número de aplicaciones en distintos campos, la eficiencia catalítica y la especificidad de las enzimas naturales se ve tremendamente afectada en condiciones extremas de temperatura y pH y presencia de ciertas proteasas [Wang, 2018]. Con objeto de superar estas importantes limitaciones, se han desarrollado una gran variedad de nanomateriales con un tamaño, composición y forma cuidadosamente controlados, capaces de imitar de manera efectiva y más robusta las funciones catalíticas de las enzimas de origen biológico [Zhou, 2017] y con aplicabilidad demostrada en terapias dirigidas contra el cáncer, diagnóstico médica, toxicología medioambiental, y más actualmente, en técnicas electroquímicas y bioanalíticas de análisis [Golchin, 2017]. Este tipo de nanomateriales, conocidos comúnmente como “nanozimas”, entre los que se incluyen metales y nanopartículas de óxidos metálicos, como Fe_2O_3 , CeO_2 , Au, y complejos de Cu^{2+} , pueden operar tanto en sistemas acuosos como no acuosos con una actividad catalítica dependiente de su tamaño y disposición atómica, pudiendo incluso superar a la de las enzimas naturales, gracias a la presencia de múltiples sitios catalíticos localizados a lo largo de su estructura. El excelente rendimiento catalítico de estas entidades artificiales se ha demostrado activamente en diversos sistemas, especialmente en aquellos basados en procesos catalíticos en los que intervienen moléculas de pequeño tamaño como sustratos (radicales de oxígeno y H_2O_2), donde la especificidad de la reacción no requiere una gran demanda estérica por parte de las enzimas nativas [Korschelt, 2018].

Desde el punto de vista práctico, algunas de las nanozimas disponibles han reemplazado a las entidades enzimáticas de origen biológico para el desarrollo de todo tipo de biosensores aplicables a la detección de una gran variedad de dianas moleculares y metabolitos de interés. Sin embargo, pese a la enorme evolución y progreso que ha experimentado este campo, algunos de los inconvenientes que obstaculizan la completa sustitución de las enzimas naturales por estos simuladores de tamaño nanométrico están relacionados con su selectividad y actividad catalítica, por lo que en la actualidad se están dedicando importantes esfuerzos al estudio y la mejora de estos aspectos [Zhou, 2017].

El polímero de coordinación Azul de Prusia (PB), descubierto hace más de 200 años, junto con otras variantes metálicas que comparten la misma estructura, se ha empleado activamente en electroquímica, bioquímica, biomedicina y electromagnetismo. Análogamente, las nanopartículas de Azul de Prusia (PBNPs), con actividad de tipo HRP, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), han demostrado un comportamiento excepcional para la captura de especies reactivas de oxígeno (ROS) altamente involucradas en procesos de apoptosis y muerte celular relacionados con numerosas enfermedades [Zhang, 2016^c].

La estructura del PB está compuesta por iones Fe^{3+} y el complejo hexacianoferrato $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2+}$ distribuidos de forma tal que los centros Fe^{2+} se encuentran coordinados al átomo de C de los ligandos CN^- que actúan de puente con los centros Fe^{3+} , coordinados de manera octaédrica por seis átomos de N, tal y como se esquematiza en la **Figura 119**. Su preparación consiste, generalmente, en la mezcla de sales de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y de Fe^{3+} obteniéndose una fórmula molecular dependiente de las cantidades estequiométricas de cada reactivo de partida, así como de las condiciones experimentales empleadas en el proceso de síntesis [Dacarro, 2018].

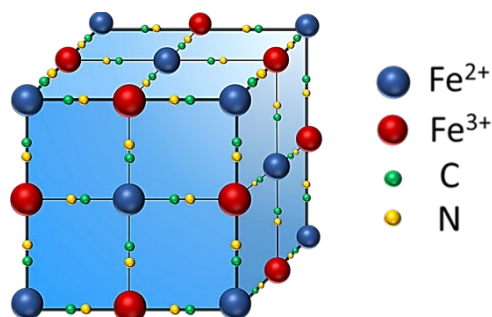


Figura 119: Esquema general de la estructura cúbica de Azul de Prusia compuesta por centros metálicos Fe^{2+} y Fe^{3+} conectados a través de los ligandos CN^- que actúan de puente.

Por tanto, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, y teniendo en cuenta las ventajas que ofrece el empleo de nanomateriales con actividad peroxidasa intrínseca, en una de las estancias disfrutadas durante la realización de esta Tesis Doctoral (en el Grupo de investigación liderado por el Prof. Itamar Willner en la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel), se ha llevado a cabo la síntesis, caracterización estructural y evaluación de la aplicabilidad real de PBNPs y sus análogos estructurales de Co, Fe-Co y Cu como catalizadores efectivos de distintos procesos de oxidación relevantes desde el punto de vista biológico, celular y analítico.

4.3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE PBNPs Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES METÁLICOS

El procedimiento experimental llevado a cabo para la síntesis de las PBNPs consistió en la adición lenta de una disolución que contenía 0.2 mmoles de $K_4[Fe(CN)_6]$ y 5.0 mmoles de ácido cítrico, sobre una disolución acuosa de 5.0 mmoles de ácido cítrico y 0.2 mM de $FeCl_3$, a una temperatura controlada de 60 °C, y bajo agitación magnética constante. La mezcla resultante se agitó magnéticamente durante 1 minuto a la misma temperatura y, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 5 minutos adicionales tras el descenso de la temperatura, obteniéndose un coloide de color azul intenso que se precipitó con acetona y se separó de la fase acuosa mediante un proceso de centrifugación a 11000 rpm durante 10 minutos. El producto resultante se lavó con etanol y agua destilada y se secó a vacío durante 12 horas.

Siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito, se llevó a cabo la síntesis de los análogos estructurales de Cu (CuFe NPs) empleando dos disoluciones acuosas conteniendo 0.1 mmoles de $K_3[Fe(CN)_6]$ y 5.0 mmoles de ácido cítrico, y 0.04 mmoles de $FeCl_2$, 0.11 mmoles de $CuCl_2$ y 5.0 mmoles de ácido cítrico, respectivamente. Para la obtención de los análogos estructurales de Co (FeCo NPs) y Fe-Co (FeCoFe NPs) se llevaron a cabo protocolos de síntesis similares a los de las PBNPs y CuFe NPs, pero empleando $CoCl_2$ y $K_3[Fe(CN)_6]$ en lugar de $FeCl_3$, y $K_4[Fe(CN)_6]$ y $Co(OAc)_2$ en lugar de $CuCl_2$, respectivamente [Shokouhimehr, 2010], [Wang, 2017^e].

Los distintos clusters inorgánicos preparados, con fórmula molecular $\text{Fe}_{1.33}\text{Fe}(\text{CN})_6$ (PBNPs), $\text{Cu}_{1.33}[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{0.667}$ (CuFe NPs), $\text{FeCo}_{0.37}(\text{CN})_4$ (FeCo NPs) y $\text{Fe}[\text{Co}_{0.2}\text{Fe}_{0.8}(\text{CN})_6]$ (FeCoFe NPs), se caracterizaron exhaustivamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (SEM), difracción de Rayos X, espectroscopía de absorción molecular UV-VIS y espectroscopía de emisión óptica con acoplamiento de plasma inductivo (ICP-OES).

Los resultados obtenidos con las diferentes técnicas se muestran en las **Figuras 120 y 121**, y en la **Tabla 38**.

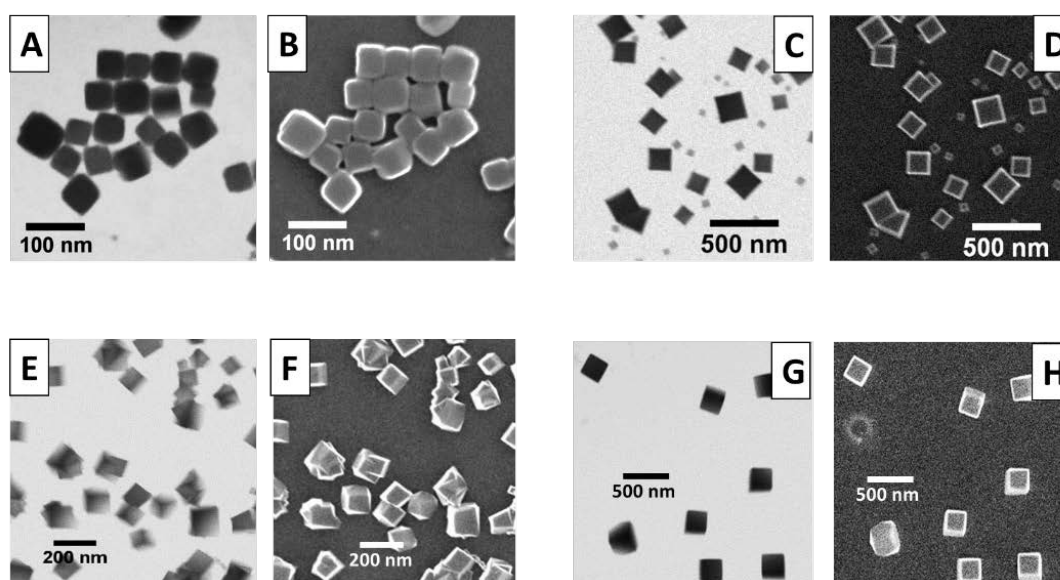


Figura 120: Microscopías electrónicas de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) obtenidas para PBNPs (A y B), FeCo NPs (C y D), CuFe NPs (E y F) y FeCoFe NPs (G y H).

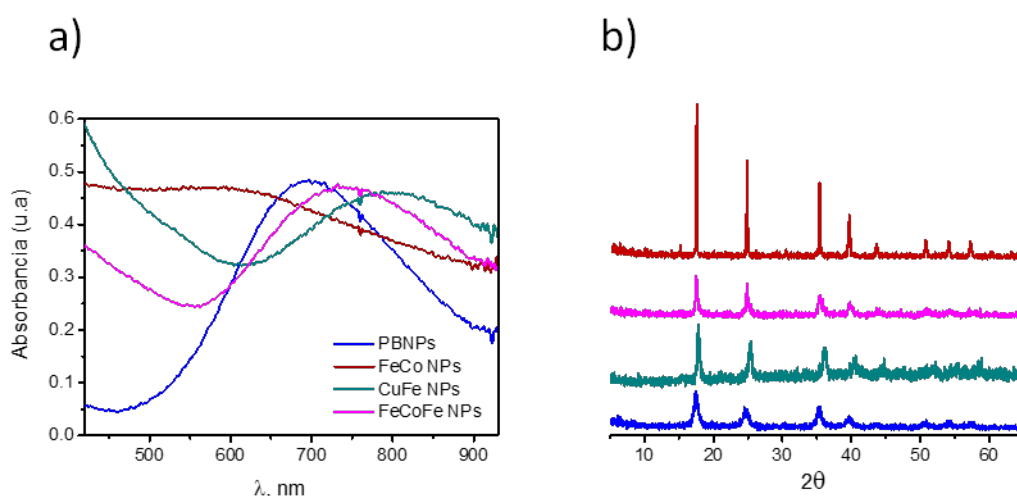


Figura 121: Caracterización estructural de las distintas NPs mediante espectroscopía de adsorción UV-VIS y difracción de Rayos X. Espectros de absorción (a) y patrones de difracción de Rayos X (b) obtenidos para PBNPs (—), FeCo NPs (—), CuFe NPs (—) y FeCoFe NPs (—).

Los espectros de absorción molecular (**Figura 121a**) reflejaron la obtención de una banda ancha en un rango de λ comprendido entre 550–900 nm para las PBNPs, con un máximo localizado a ~ 705 nm, resultante de la transferencia de carga entre los centros iónicos Fe^{III} y Fe^{II} a través de los puentes de CN^- , lo que está de acuerdo con resultados reportados por otros autores [Hoffman, 2014], [Bui, 2018]. Los análogos de Cu y FeCoFe revelaron unos máximos de absorción ligeramente desplazados a λ superiores, en comparación con las PBNPs, mientras que para las FeCo NPs el máximo, de una intensidad significativamente menor en comparación con las anteriores, estaba localizado a una λ de ~ 600 nm.

Desde el punto de vista morfológico y estructural, la información proporcionada por las técnicas microscópicas y de Rayos X (**Figuras 120 y 121b**, respectivamente) confirmó unos tamaños comprendidos entre 40–50 nm para las PBNPs, y entre 100–200 nm para los análogos de Co, Cu y Fe-Co y la obtención de patrones de difracción similares para los distintos tipos de nanopartículas y correspondientes al patrón característico de sistemas con estructura cúbica centrada en las caras pertenecientes al grupo espacial $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$. Estos resultados ponen de manifiesto que la celda unidad de las PBNPs permaneció inalterable tras la sustitución de los iones correspondientes en cada caso para la preparación de los distintos análogos estructurales.

Por otro lado, los resultados recogidos en la **Tabla 38**, obtenidos mediante ICP-OES, confirmaron la presencia y porcentaje de cada uno de los iones metálicos que componen las distintas nanoestructuras.

Tabla 38: Determinación de los porcentajes de Fe, Co y Cu obtenidos mediante ICP-OES presentes en cada tipo de NPs.

<i>Tipo de nanomaterial</i>	<i>% Fe</i>	<i>% Co</i>	<i>% Cu</i>
<i>PBNPs</i>	<i>35.0</i>	<i>--</i>	<i>--</i>
<i>FeCo NPs</i>	<i>13.5</i>	<i>17.1</i>	<i>--</i>
<i>CuFe NPs</i>	<i>21.5</i>	<i>--</i>	<i>17.8</i>
<i>FeCoFe NPs</i>	<i>19.5</i>	<i>15.8</i>	<i>--</i>

4.3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PBNPs Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES EN PROCESOS OXIDATIVOS RELEVANTES

Una vez caracterizado cada nanomaterial, se evaluaron y compararon las propiedades catalíticas de PBNPs y sus análogos estructurales de Cu (CuFe NPs), Co (FeCo NPs) y Fe-Co (FeCoFe NPs) en los procesos de oxidación de dopamina, NADH, y luminol, en presencia de H_2O_2 , mediante espectroscopía de absorción molecular y quimioluminiscencia.

- Oxidación de dopamina

Las propiedades catalíticas de las distintas NPs para la oxidación de dopamina se evaluaron comparando las variaciones de las intensidades de absorción del producto ópticamente activo formado (aminocromo), a una $\lambda_{\text{máxima}} = 480 \text{ nm}$ ($\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en disolución reguladora de MES 10 mM (pH 5.5) conteniendo $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs o del análogo estructural correspondiente en cada caso, 2.0 mM de H_2O_2 y concentraciones variables de dopamina en un rango comprendido entre 0.0 y 1.0 mM.

Las velocidades del proceso catalítico de oxidación obtenidas con cada una de las NPs evaluadas, para concentraciones crecientes de dopamina (**Figura 122**) pusieron claramente de manifiesto la excelente actividad catalítica de las PBNPs, con una $V_{\text{máxima}}$ de $22 \mu\text{M min}^{-1}$, en comparación con los valores obtenidos para los análogos estructurales, de 0.2 (FeCo NPs), 1.6 (FeCoFe NPs) y 3.4 (CuFe NPs) $\mu\text{M min}^{-1}$.

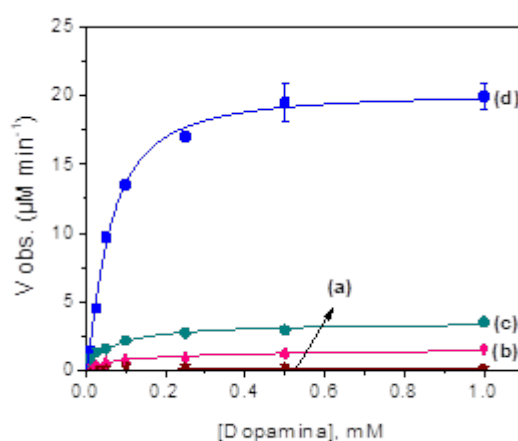


Figura 122: Evaluación de la actividad catalítica de las distintas NPs para la oxidación de dopamina a aminocromo ($\lambda_{\text{máxima}} = 480 \text{ nm}$). Comparación de la velocidad del proceso de oxidación catalítica en presencia de FeCo NPs (a), FeCoFe NPs (b), CuFe NPs (c) y PBNPs (d).

La confirmación de que tanto la estructura de las PBNPs como la presencia simultánea de los distintos iones metálicos que la conforman resultan determinantes en sus propiedades catalíticas para el proceso evaluado, se pone claramente de manifiesto en los resultados de la **Figura 123**, en la que se comparan las velocidades de oxidación para concentraciones crecientes de dopamina en presencia de 2.0 mM de H_2O_2 , y de $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs, Fe^{2+} , y Fe^{3+} , respectivamente. La ausencia de actividad catalítica observada por parte de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} libres en disolución, confirma que su disposición espacial en la estructura de las nanopartículas resulta esencial para la catálisis efectiva de la oxidación del neurotransmisor.

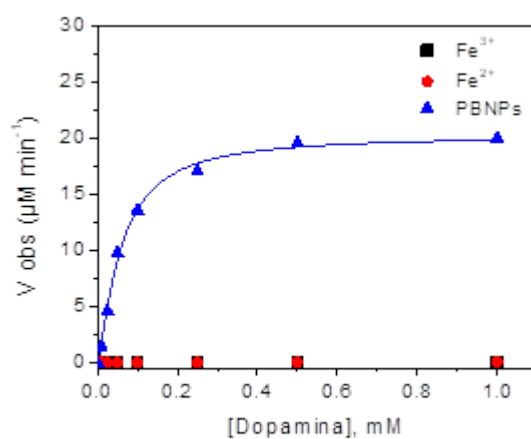


Figura 123: Comparación de la velocidad del proceso de oxidación catalítica de dopamina en presencia de 2.0 mM de H_2O_2 y $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs, Fe^{3+} , y Fe^{2+} .

Por otro lado, la variación de las velocidades de oxidación con la concentración de dopamina, para cantidades variables de PBNPs comprendidas entre 1.0 y $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (**Figura 124**), demostró el aumento de la velocidad del proceso catalítico con la concentración de NPs. A la vista de estos resultados se seleccionó una concentración de $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs para estudios posteriores.

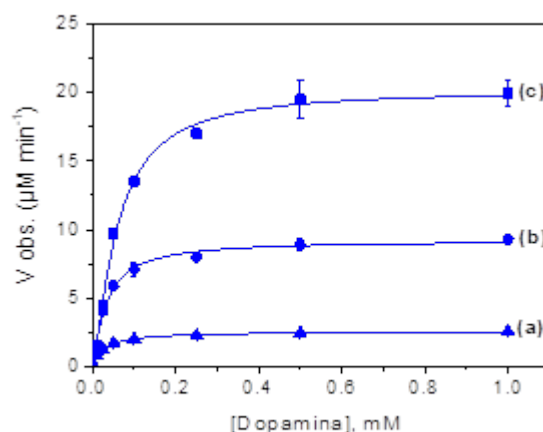


Figura 124: Variación de la velocidad de oxidación de concentraciones crecientes de dopamina en presencia de 2.0 mM de H_2O_2 y $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a), $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b) y $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) de PBNPs.

Una vez seleccionadas el tipo y la cantidad de NPs que proporcionaron los mejores resultados para el proceso evaluado, se registraron las intensidades de absorción del producto de reacción obtenido (aminocromo) a $\lambda = 480 \text{ nm}$ para un tiempo fijo de reacción de 2 horas, así como la variación de la absorbancia del aminocromo en función del tiempo de reacción (**Figura 125a** y **125b**, respectivamente). Para estos experimentos se emplearon 2.0 mM de H_2O_2 , $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs y concentraciones de dopamina comprendidas entre 0.0 y 1.0 mM.

Los resultados obtenidos, que demuestran intensidades de absorción mayores para concentraciones crecientes de dopamina, revelaron el excelente comportamiento catalítico de las PBNPs para la oxidación de la catecolamina seleccionada, en presencia de H_2O_2 (**Figura 125a**), así como un aumento en la variación de la intensidad de absorción de aminocromo con el tiempo de reacción, especialmente cuando se trabaja con concentraciones elevadas de dopamina (**Figura 125b**).

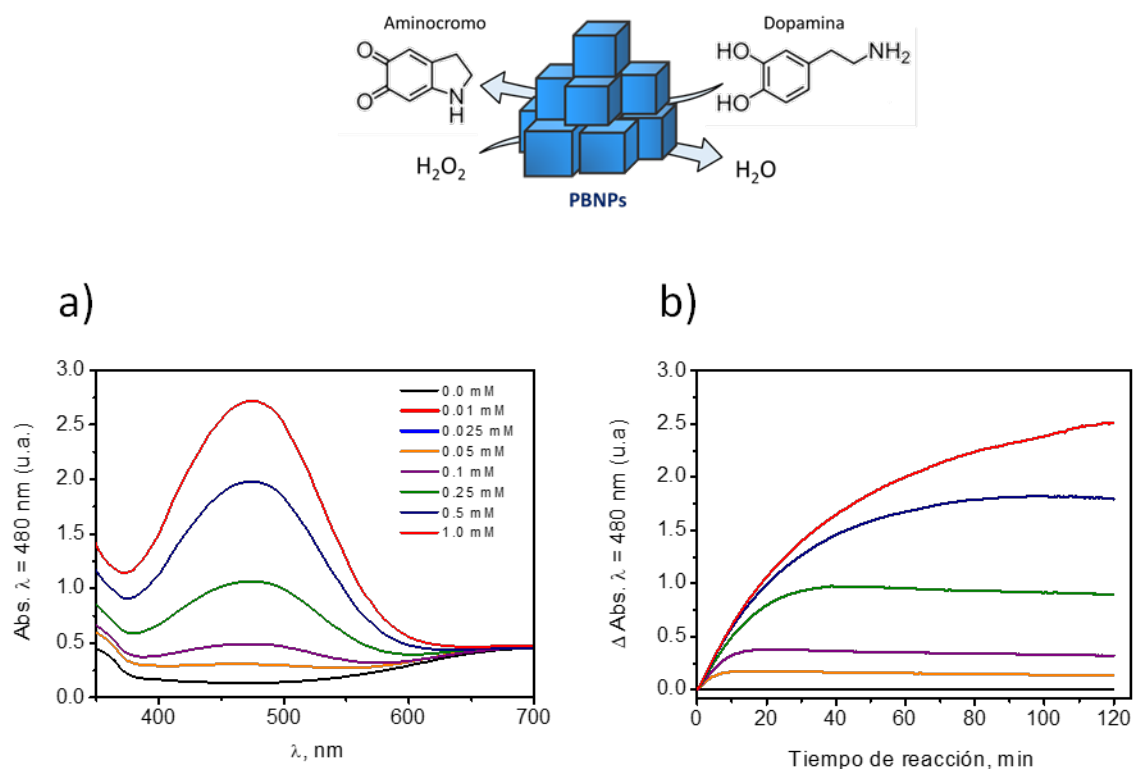


Figura 125: Espectros de absorción correspondientes al aminocromo generado tras un tiempo de reacción fijo de 2 horas (a) y variación de la intensidad de absorción de aminocromo en función del tiempo de reacción (b), en presencia de concentraciones de dopamina comprendidas entre 0.0–1.0 mM, $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs y 2.0 mM de H_2O_2 .

Adicionalmente, y con el objetivo de ampliar los campos de aplicación de los distintos nanomateriales sintetizados, se llevó a cabo la evaluación de la actividad catalítica de los mismos en procesos de oxidación de luminol y del cofactor NADH.

- Oxidación de luminol

De entre los distintos tipos de biosensores ópticos, aquellos basados en un sistema de detección quimioluminiscente resultan particularmente sensibles debido a que los fotones que intervienen en el proceso de emisión de luz se producen químicamente en la oscuridad y por tanto se miden de manera eficiente en ausencia de interacciones inespecíficas como las que derivan de la fuente de excitación en las metodologías fotoluminiscentes [Roda, 2016].

Habitualmente, las reacciones quimioluminiscentes pueden generarse a partir de dos mecanismos fundamentales clasificados como reacciones directas o indirectas, en función del tipo y modo en que la energía de la especie excitada es transferida. En los mecanismos

quimioluminiscentes directos, la reacción entre dos especies, normalmente un sustrato y un oxidante, en presencia un catalizador, genera un producto de reacción (o un intermedio) en un estado electrónicamente excitado cuya relajación a su estado fundamental de energía produce la emisión de un fotón. Los catalizadores que intervienen en el proceso, tanto enzimas como iones metálicos, reducen la energía de activación y proporcionan un ambiente adecuado para la generación eficiente de quimioluminiscencia [Fereja, 2013].

Durante décadas, las extraordinarias propiedades fisicoquímicas y catalíticas que caracterizan a algunas nanopartículas metálicas también se han aprovechado para el desarrollo de todo tipo de dispositivos de biosensado luminiscentes ofreciendo unas propiedades mejoradas en términos de sensibilidad (debido a la amplificación de la señal de quimioluminiscencia obtenida [Roda, 2011]) y reversibilidad. Las aplicaciones de este tipo de dispositivos quimioluminiscentes con propiedades mejoradas abarcan campos muy diversos que incluyen química, farmacología, biología molecular, medicina clínica, contaminación y medio ambiente y ciencia de los alimentos [Chen, 2017].

Las propiedades catalíticas de las distintas NPs en el proceso de generación de quimioluminiscencia se evaluaron comparando las intensidades de emisión del producto resultante de la oxidación de luminol, empleando H_2O_2 como agente oxidante. Para ello, se prepararon mezclas que contenían 0.5 mM de luminol, 0.1 mM de H_2O_2 , y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada tipo de NPs, en disolución reguladora de fosfato 400 mM (pH 9.0) y se monitorizó la intensidad quimioluminiscente emitida por el ácido aminoftálico formado tras el proceso oxidativo a una $\lambda = 425 \text{ nm}$, resultando los espectros que se muestran en la **Figura 126**.

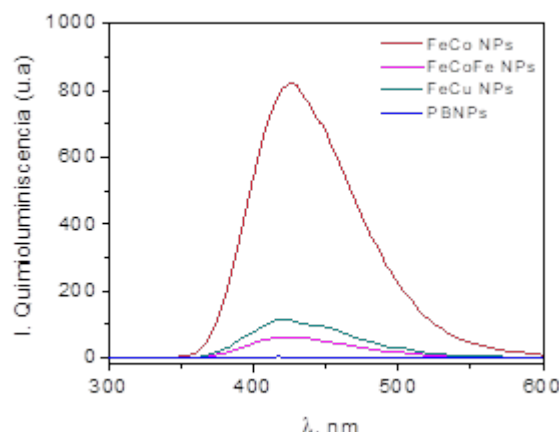


Figura 126: Espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso de oxidación catalítica de luminol en presencia de H_2O_2 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada una de las NPs indicadas. Condiciones experimentales: $[\text{Luminol}] = 0.5 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.1 \text{ mM}$.

Como se observa, la mayor intensidad de quimioluminiscencia se registró en presencia de las FeCo NPs alcanzándose una intensidad de emisión máxima a $\lambda = 425 \text{ nm}$ que resultó ser 8 y 16 veces superior a la obtenida en presencia de CuFe NPs y FeCoFe NPs, respectivamente. Estos resultados confirmaron el excelente funcionamiento de los análogos de cobalto propuestos (FeCo NPs) para la generación rápida y eficiente de quimioluminiscencia en las condiciones experimentales establecidas.

Con objeto de justificar la excepcional y nula actividades catalíticas que ofrecen las FeCo NPs y las PBNPs, respectivamente, en este sistema oxidativo particular, y puesto que, de manera convencional, el proceso de generación de quimioluminiscencia se lleva a cabo en presencia de la enzima HRP como catalizador biológico, se compararon las intensidades de quimioluminiscencia generadas por el sistema luminol- H_2O_2 -HRP, en ausencia y en presencia de las distintas nanoestructuras metálicas sintetizadas.

La disminución de las intensidades de quimioluminiscencia obtenidas en presencia de FeCoFe NPs, CuFe NPs y PBNPs (**Figura 127**) indicaron que estos tres tipos de NPs parecen inactivar tanto el sistema luminol- H_2O_2 -HRP como algunos productos generados en el mismo.

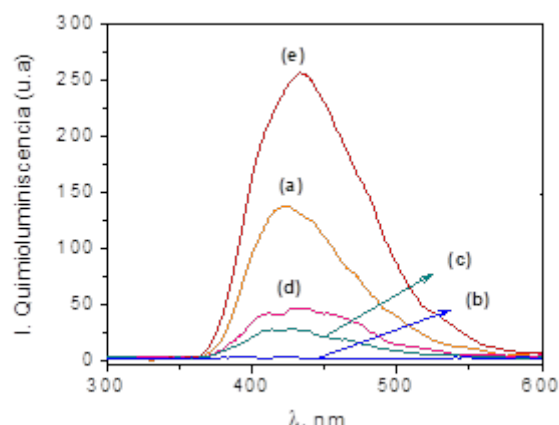


Figura 127: Espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso de oxidación catalítica de luminol en presencia de H_2O_2 y la enzima HRP en ausencia (a) y en presencia de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs (b), CuFe NPs (c), FeCoFe NPs (d) y FeCo NPs (e). Condiciones experimentales: $[\text{Luminol}] = 0.5 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.025 \text{ mM}$; $[\text{HRP}] = 0.54 \text{ U mL}^{-1}$.

Sin embargo, la adición de FeCo NPs al sistema convencional de generación de quimioluminiscencia doblaba la intensidad obtenida, lo que justifica que estas NPs presentan una actividad catalítica similar a la de la enzima de origen natural en este tipo de procesos de generación de luz.

Una vez demostrado el excelente funcionamiento de estos análogos metálicos, se llevó a cabo la selección de la concentración óptima de los mismos, mediante la comparación de las intensidades de quimioluminiscencia generadas en presencia de 0.5 mM de luminol, 0.1 mM de H_2O_2 y concentraciones variables de FeCo NPs en el rango entre $25\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (**Figura 128a**) se seleccionó una concentración de FeCo NPs de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para estudios posteriores.

Nuevamente y con la finalidad de demostrar que la estructura y composición de FeCo NPs resultan esenciales también para la catálisis en el proceso luminiscente, se compararon los espectros registrados en presencia de las FeCo NPs y de cada uno de los iones metálicos que conforman su estructura (**Figura 128b**). La ausencia de respuesta obtenida cuando el proceso catalítico se llevó a cabo en presencia de iones Co^{2+} y Fe^{3+} libres en disolución confirmaron, una vez más, el papel relevante que juegan tanto la composición como la morfología de un nanomaterial en su actividad catalítica hacia un determinado proceso.

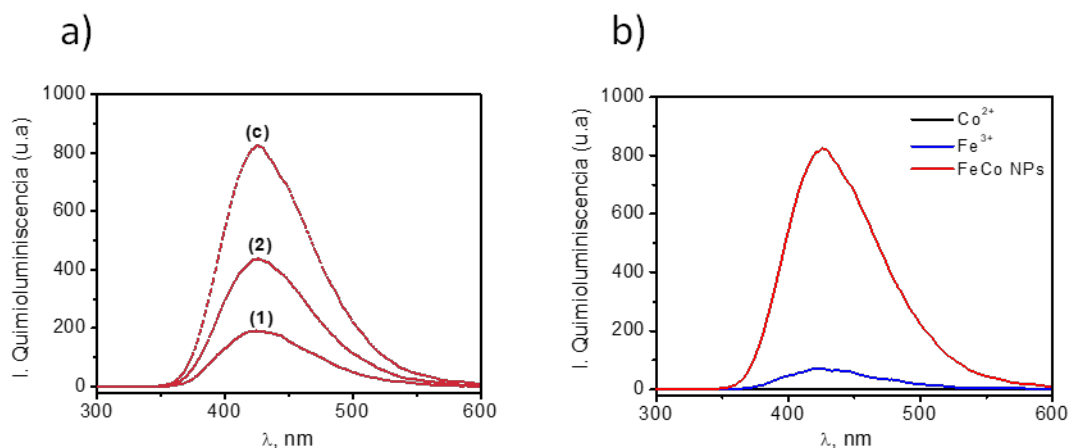


Figura 128: Espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso de oxidación catalítica de luminol en presencia de H_2O_2 y (1) $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (2) $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ y (3) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FeCo NPs (a). Comparación de los espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso oxidativo empleando $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Co^{2+} , Fe^{3+} y FeCo NPs (b). Condiciones experimentales: $[\text{Luminol}] = 0.5 \text{ mM}$ y $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.1 \text{ mM}$.

La eficiencia de los análogos estructurales de Co (FeCo NPs) como catalizadores apropiados para la generación de quimioluminiscencia se llevó a cabo monitorizando a $\lambda = 425 \text{ nm}$ la intensidad de emisión del producto ópticamente activo obtenido en presencia de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FeCo NPs, 0.5 mM de luminol, y concentraciones variables del agente oxidante, comprendidas entre 0.01 – 0.1 mM . Los espectros de quimioluminiscencia obtenidos, así como la dependencia de la intensidad máxima de emisión con la concentración de H_2O_2 se muestran en las **Figuras 129a y 129b**, respectivamente.

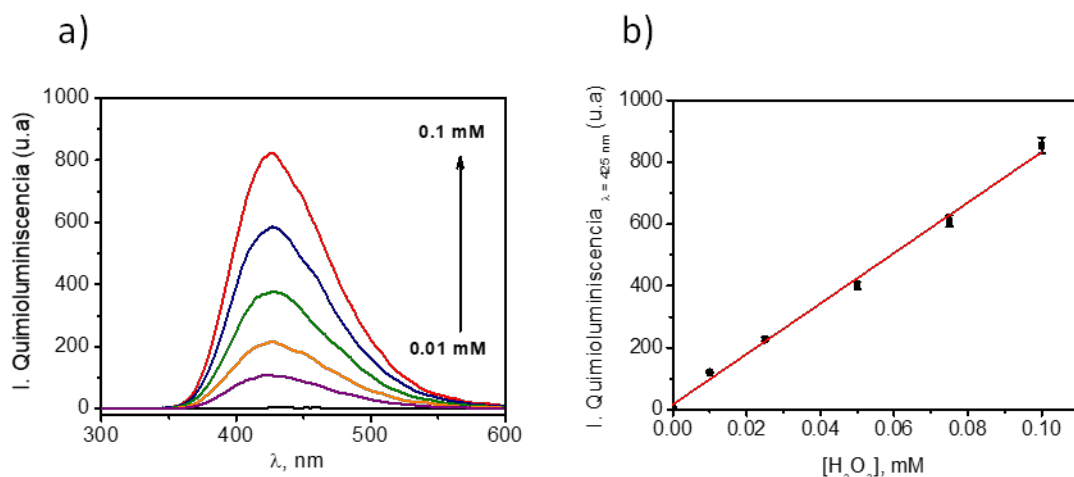


Figura 129: Espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso de oxidación de luminol catalizada por las FeCo NPs empleando concentraciones crecientes de H_2O_2 (a) y dependencia de la intensidad máxima de luminiscencia obtenida en función de la concentración de H_2O_2 (b). Condiciones experimentales: $[\text{Luminol}] = 0.5 \text{ mM}$; $[\text{FeCo NPs}] = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Finalmente, y teniendo en cuenta que como demuestran los resultados presentados, las FeCo NPs se comportan como entidades efectivas para la generación de luz en presencia de H_2O_2 o de sustratos que generen H_2O_2 tras su oxidación catalítica en condiciones aeróbicas, como los sistemas que involucran glucosa/GOx, lactato/LOx y colina/ChOx, se evaluó el empleo de los análogos metálicos propuestos para la fabricación de un biosensor óptico para la determinación indirecta de glucosa.

El biosensor desarrollado (**Figura 130**) se basaba en una primera etapa de oxidación aeróbica de glucosa catalizada por la enzima GOx para la obtención de ácido glucónico y H_2O_2 . El H_2O_2 producido, directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en el medio, se empleaba para la generación de quimioluminiscencia a partir de la oxidación de luminol catalizada por las FeCo NPs.

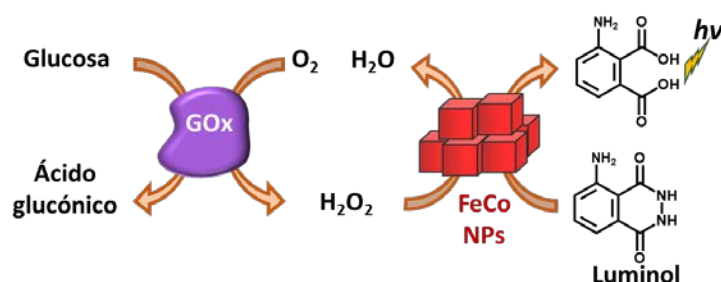


Figura 130: Acoplamiento de las FeCo NPs al sistema de oxidación aeróbica de glucosa mediada por la enzima GOx para el desarrollo de un biosensor óptico de glucosa.

Con el fin de evaluar el funcionamiento del biosensor se prepararon disoluciones que contenían 4.0 U mL^{-1} de GOx y concentraciones variables de glucosa en el intervalo de concentración comprendido entre 0.0 y 1.0 mM, en disolución reguladora de acetato 10 mM (pH 5.0), que se dejaron reaccionar bajo atmósfera controlada de oxígeno durante 30 minutos y a 35°C . A continuación, se monitorizó la intensidad de quimioluminiscencia generada a partir de cada una de ellas mediante la oxidación catalítica de luminol (0.5 mM) en presencia de la concentración óptima de FeCo NPs ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), en disolución reguladora de fosfato 400 mM (pH 9.0).

La **Figura 131** muestra los espectros de quimioluminiscencia registrados (**Figura 131a**) y la dependencia lineal entre las intensidades máximas de emisión obtenidas a $\lambda = 425 \text{ nm}$ con la concentración de glucosa (**Figura 131b**).

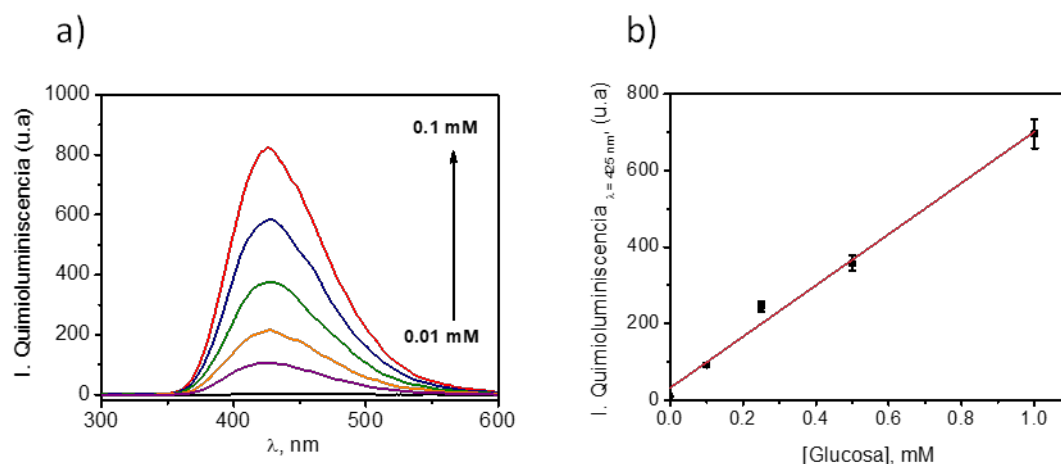


Figura 131: Espectros de quimioluminiscencia generados en el proceso de oxidación de luminol en presencia de FeCo NPs y el H_2O_2 resultante de la oxidación aeróbica de concentraciones variables de glucosa en presencia de GOx (a). Dependencia de la intensidad máxima de emisión obtenida a $\lambda = 425 \text{ nm}$ en función de la concentración de glucosa (b). Condiciones experimentales: [Luminol] = 0.5 mM; [FeCo NPs] = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Es importante destacar que, aunque no era uno de los objetivos iniciales de este trabajo de investigación, el biosensor de glucosa desarrollado basado en el sistema luminol- H_2O_2 -FeCo NPs presenta unas características adecuadas para la determinación indirecta y sensible de glucosa, teniendo en cuenta que sus niveles normales en sangre oscilan entre 3.5–5.5 mM [Güemes, 2015].

- Oxidación de NADH

Finalmente, dada la importancia biológica y metabólica del cofactor NADH y su producto de oxidación NAD^+ en diversas funciones celulares, entre las que se incluyen la síntesis y reparación de DNA, síntesis de proteínas, transferencia energética y producción de neurotransmisores como dopamina y serotonina, se evaluó la eficiencia de las distintas nanopartículas sintetizadas para la oxidación catalítica de NADH en presencia de H_2O_2 .

Para ello, se prepararon mezclas que contenían concentraciones variables de NADH comprendidas entre 0.0–0.5 mM, 2.0 mM de H_2O_2 y $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada una de las NPs evaluadas, en disolución reguladora de HEPES 25 mM (pH 7.2) suplementada con 10 mM de MgCl_2 y 25 mM de NaCl. Tras un tiempo fijo de reacción de 240 minutos, se monitorizó espectroscópicamente la oxidación catalítica del cofactor a la $\lambda_{\text{máxima}} = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Los resultados que se presentan en la **Figura 132a** indicaron que, aunque los cuatro tipos de NPs preparadas catalizaban el proceso de oxidación del NADH, se obtenía la mayor eficiencia catalítica con las PBNPs con velocidades de oxidación notablemente superiores a las obtenidas en presencia de los distintos análogos estructurales de Co, Cu y Fe-Co.

Adicionalmente, debido a que el proceso oxidativo se encuentra controlado por la concentración de las PBNPs presentes en el medio, se evaluó la absorbancia del NADH residual tras la oxidación catalítica del mismo, en presencia de H_2O_2 y concentraciones variables de PBNPs en un rango comprendido entre $0.0\text{--}10.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose, como se esperaba, una disminución de la intensidad máxima de absorción con la concentración de las PBNPs en el sistema, como consecuencia de la oxidación catalítica de una mayor cantidad de NADH (**Figura 132b**).

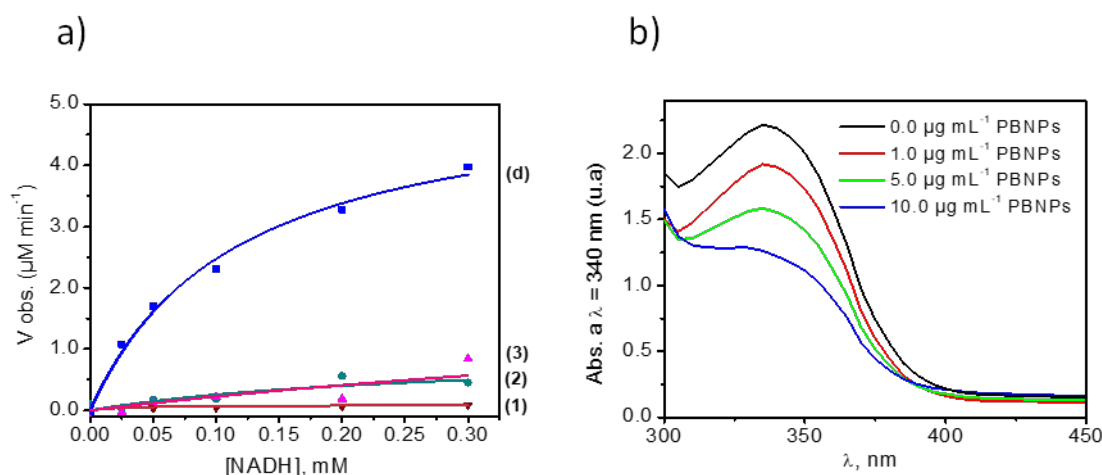


Figura 132: Evaluación de la actividad catalítica de las distintas NPs para la oxidación de NADH ($\lambda_{\text{máxima}} = 340\ \text{nm}$). Comparación de la velocidad del proceso de oxidación catalítica de concentraciones crecientes de NADH en presencia de $2.0\ \text{mM}$ de H_2O_2 y $10.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de (1) FeCo NPs, (2) CuFe NPs, (3) FeCoFe NPs y (4) PBNPs (a). Espectros de absorción del NADH residual tras la oxidación catalítica de $0.3\ \text{mM}$ de NADH en presencia de $2.0\ \text{mM}$ de H_2O_2 y concentraciones variables de PBNPs durante un tiempo de reacción de 240 minutos (b).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó una concentración de PBNPs de $10.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ como óptima para la oxidación catalítica de NADH en presencia de H_2O_2 . Empleando estas condiciones se registró la variación de la absorbancia con el tiempo para la oxidación catalítica de concentraciones variables de NADH ($0.0\text{--}0.5\ \text{mM}$), en presencia de $2.0\ \text{mM}$ de H_2O_2 y $10.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs (**Figura 133b**).

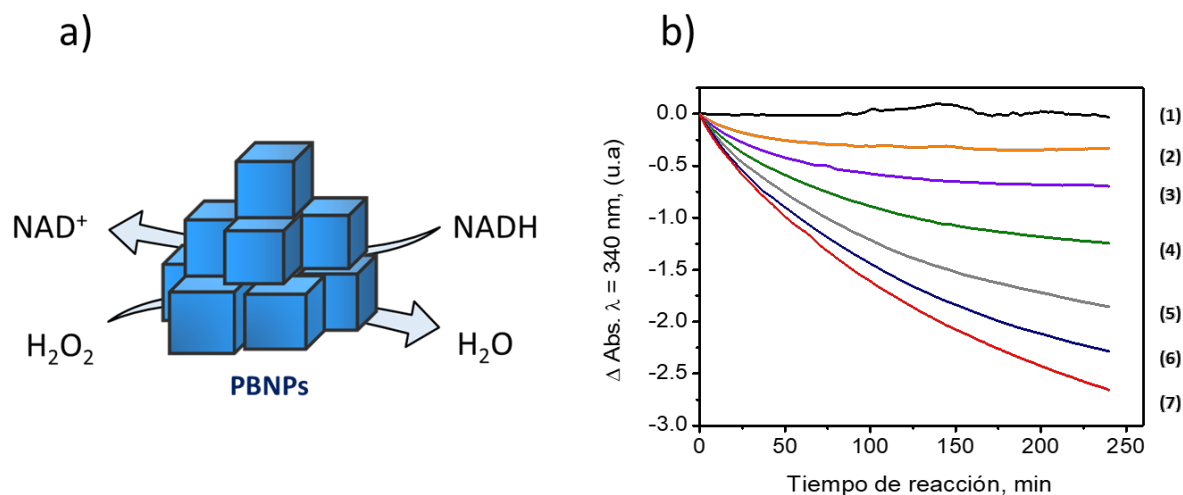


Figura 133: Esquema del proceso de oxidación catalítica de NADH a NAD^+ mediante PBNPs y H_2O_2 (a) y variación de la intensidad de absorción del NADH residual con el tiempo de oxidación de disoluciones de (1) 0.0, (2) 0.05, (3) 0.1, (4) 0.2, (5) 0.3, (6) 0.4 y (7) 0.5 mM de NADH (b). Condiciones experimentales: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2.0 \text{ mM}$; $[\text{PBNPs}] = 10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Uno de los aspectos más importantes en los procesos de oxidación de NADH radica en la confirmación de que el cofactor es efectivamente oxidado a NAD^+ y no a otras especies biológicamente inactivas como productos de dimerización $(\text{NAD})_2$. Esto resulta particularmente relevante ya que la oxidación catalítica de NADH puede proporcionar una ruta general para la regeneración eficaz de NAD^+ , actuando como un mecanismo versátil para diversas transformaciones químicas basadas en enzimas dependientes de la forma oxidada activa de NADH: NAD^+ .

Con la finalidad de demostrar que la disminución observada de la intensidad de absorción se producía únicamente como consecuencia de la transformación de NADH a NAD^+ , se llevó a cabo el acoplamiento entre el sistema de oxidación catalítica de NADH propuesto y la enzima alcohol deshidrogenasa (AlcDH), que cataliza la oxidación de alcoholes a aldehídos (o cetonas) en presencia de NAD^+ (**Figura 134a**). Para ello se prepararon disoluciones que contenían 0.1 mM de NADH, 2.0 mM de H_2O_2 y $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PBNPs, en disolución reguladora de HEPES 25 mM (pH 7.2) suplementada con 10 mM de MgCl_2 y 25 mM de NaCl y, tras un tiempo de reacción de 150 minutos que aseguraba la conversión de la mayor parte de NADH al producto ópticamente inactivo NAD^+ y cofactor de la AlcDH, se llevó a cabo la adición al sistema de 2.0 mM de etanol y 50.0 U de AlcDH, monitorizándose la regeneración del NADH con el tiempo, tal y como demuestra la **Figura 134b**.

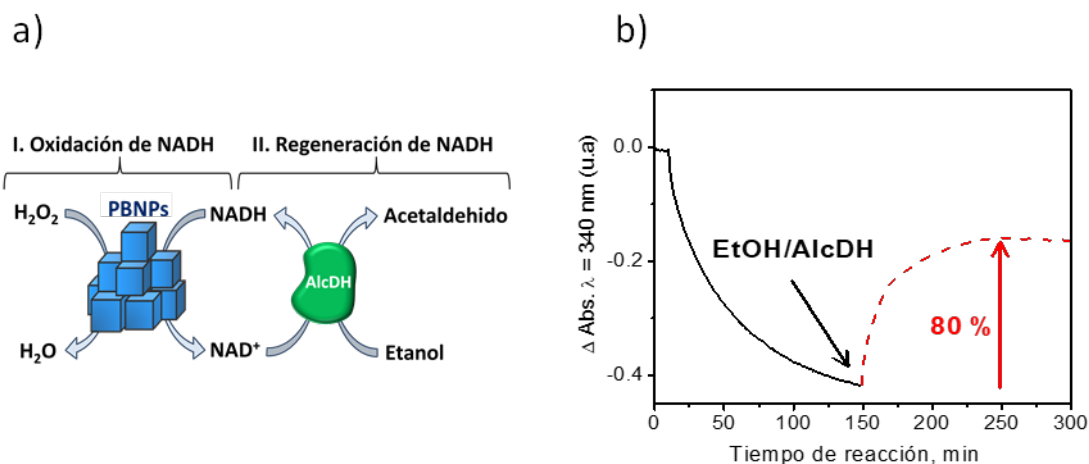


Figura 134: Esquema de regeneración de NADH mediante el acoplamiento del proceso de oxidación del NADH catalizado por las PBNPs y el sistema AlcDH/Etanol (a) y variación de la intensidad de absorción con el tiempo del NADH residual como consecuencia de la producción de NAD⁺ y consecuente regeneración de NADH tras la adición de AlcDH/Etanol (b). Condiciones experimentales: [NADH] = 0.1 mM; [H₂O₂] = 2.0 mM; [PBNPs] = 10.0 μ mL⁻¹; [AlcDH] = 333.3 U mL⁻¹; [Etanol] = 2.0 mM.

Los resultados obtenidos demostraron un incremento en la variación de la absorbancia del NADH residual correspondiente al 80 % tras la adición de AlcDH junto con su sustrato, lo que confirma la regeneración efectiva del NADH y, por tanto, demuestra que el producto de oxidación catalítica resultante es, efectivamente, NAD⁺.

El conjunto de los resultados presentados en este Capítulo de esta Tesis Doctoral demuestra que los distintos nanomateriales propuestos, preparados de una manera sencilla, rápida y asequible, presentan actividad catalítica intrínseca de tipo peroxidasa y que por tanto pueden emplearse como sustitutos efectivos de la enzima de origen natural en diversos sistemas oxidativos dependientes de H₂O₂.

Además, las observaciones experimentales en cada uno de los sistemas evaluados demuestran la dependencia que existe entre la actividad enzimática y la composición de las distintas NPs de tipo cianometalato propuestas. Las excelentes propiedades catalíticas, la estabilidad y la cantidad ilimitada disponible permiten visionar aplicaciones futuras muy prometedoras de estas NPs como enzimas artificiales en los campos de la nanomedicina, y particularmente, en procesos de apoptosis celular como biocatalizadores activos para la degradación de ROS.

5. CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis several individual and dual biosensing platforms have been successfully implemented for rapid and reliable determination of high relevance cancer biomarkers at different molecular level in a wide variety of real samples and clinical specimens from different source and complexity. The selected cancer targets, some of which have been determined for the first time in this Doctoral Thesis using electrochemical biosensors, include different target proteins, hormone receptors, autoantibodies and epigenetic aberrations such as miRNAs.

The design of the presented methodologies relies on the smart combination of commercial functionalized magnetic beads, affinity bioreceptors ranging from conventional (antibodies, protein antigens and DNA and RNA synthetic sequences) to scarcely explored (recombinant HaloTag-proteins, and selective antibodies and viral proteins), ingenious bioassay formats and amperometric transduction at screen-printed carbon electrodes. The excellent analytical and operational features achieved with the implemented bioplatforms in terms of sensitivity, selectivity, simplicity and assay time, have allowed carrying out pioneer applications demonstrating the accurate determination of the selected cancer reporters in serum, saliva, cells (entire and lysed) and total RNA extracted from cells, fresh and paraffin-embedded tissues, and cytologies, after minimal treatments and using sample amounts significantly lower than those required by conventional methodologies.

Additionally, the versatility offered by the developed strategies has been cleverly exploited for their easy implementation onto dual bioplatforms which allow the simultaneous interrogation of target biomarkers of the same or different nature with the aim of improving the reliability of clinical diagnosis and prognosis.

The overall results obtained along this Doctoral Thesis demonstrate, through the exploration of new biosensorization concepts, the potential abilities of electrochemical affinity biosensors as competitive and powerful clinical diagnosis devices for cancer management which, due to their excellent features in terms of simplicity assay time, affordability and compatibility with on-site determinations can be implemented in the near future into routine clinical applications to improve cancer outcomes.

Moreover, during a predoctoral stay abroad, promising results were achieved in the preparation and characterization of different inorganic nanoclusters showing intrinsic

peroxidase like-activity, which can find tremendous application as artificial enzymes in biosensing.

6. BIBLIOGRAFÍA

A

- [Abdelwahab, 2017]:** M.A. Abdelwahab; M. M. Elbedewy; A.M. Amin; A.K. Tawfik, *Res. J Immunol.* 10 (2017) 1–7.
- [Adan, 2017]:** A. Adan; G. Alizada; Y. Kiraz; Y. Baran; A. Nalbant, *Crit Rev Biotechnol.* 37 (2017) 163–176.
- [Agasti, 2012]:** S. S. Agasti; M. Liong; V. M. Peterson; H. Lee; R. Weissleder, *J Am Chem Soc.* 134 (2012) 18499–18502.
- [Aguilar-Arteaga, 2010]:** K. Aguilar-Arteaga; J. A. Rodríguez; E. Barrado, *Anal Chim Acta.* 674 (2010) 157–165.
- [Ahmed, 2016]:** M. A. Ahmed; E. Selzer; W. Dörr; G. Jomrich; F. Harpain; G. R. Silberhumer; L. Müllauer; K. Holzmann; B. Grasl-Kraupp; M. Grusch; W. Berger; B. Marian, *Oncotarget* 7 (2016) 69976–69990.
- [Ajore, 2007]:** R. Ajore; R. Kumar; I. Kaur; R. C. Sobti; L. M. Bharadwaj, *J Biochem Biophys Methods.* 70 (2007) 779–785.
- [Akram, 2004]:** M. Akram; M. C. Stuart; D. K. Y. Wong; *Anal Chim Acta.* 504 (2004) 243–251.
- [Albanopoulos, 2000]:** K. Albanopoulos; A. Armakolas; M. M. Konstadoulakis; E. Leandros; E. Tsiobanou; S. Katsaragakis; D. Alexiou; G. Androulakis, *Am J Gastroenterol.* 95 (2000) 1056–1061.
- [Albers, 2003]:** J. Albers; T. Grunwald; E. Nebling; G. Piechotta; R. Hintsche, *Anal Bioanal Chem.* 377 (2003) 521–527.
- [Alberts, 2002]:** B. Alberts; A. Johnson; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts; P. Walter. (2002). *Proteins. En Molecular Biology of the Cell.* New York. Garland Science.
- [Albertus, 2008]:** D. L. Albertus; C. W. Seder; G. Chen; X. Wang; W. Hartojo; L. Lin; A. Silvers; D. G. Thomas; T. J. Giordano; A. C. Chang; M. B. Orringer; W. L. Bigbee; A. M. Chinnaiyan; D. G. Beer, *J Thorac Oncol.* 3 (2008) 1236–1244.
- [Albery, 1981]:** W. J. Albery, *Phil Trans R Soc Lon A.* 302 (1981) 221–235.
- [Al-Khafaji, 2012]:** Q. A. M. Al-Khafaji; M. Harris; S. Tombelli; S. Laschi; A. P. F. Turner; M. Mascini; G. Marrazza, *Electroanalysis* 24 (2012) 735–742.
- [Alonso-Lomillo, 2010]:** M. A. Alonso-Lomillo; O. Domínguez-Renedo; M. J. Arcos-Martínez, *Talanta* 82 (2010) 1629–1636.
- [Alvarez-Icaza, 1993]:** M. Alvarez-Icaza; U. Bilitewski, *Anal Chem.* 65 (1993) 525A–533A.
- [Anderson, 1963]:** R. L. Anderson; H. Chaplin, *Am J Dis Child.* 105 (1963) 19–26.
- [Anderson, 2010]:** K. S. Anderson; J. Wong; A. Vitonis; C. P. Crum; P. M. Sluss; J. LaBaer; D. Cramer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19 (2010) 859–868.

- [Anderson, 2015]: K. S. Anderson; D. W. Cramer, S. Sibani; G. Wallstrom; J. Wong; J. Park; J. Qiu; A. Vitonis; I. LaBaer, *J Proteome Res.* 14 (2015) 578–586.
- [Andreescu, 2009]: S. Andreescu; J. Njagi; C. Ispas; M. T. Ravalli, *J Environ Monit.* 11 (2009) 27–40.
- [Ardila-Molano, 2015]: J. Ardila-Molano; M. Vizcaíno; M. L. Serrano, *Rev Colomb Cancerol.* 19 (2015) 229–238.
- [Arkan, 2015]: E. Arkan; R. Saber; Z. Karimi; M. Shasipur, *Anal Chim Acta.* 874 (2015) 66–74.
- [Aro, 2017]: K. Aro; F. Wei; D. T. Wong; M. Tu, *Front Public Health.* 5 (2017) 77.
- [Arora, 2007]: K. Arora; N. Prabhakar; S. Chand; B. D. Malhotra, *Biosens Bioelectron.* (2007) 23, 613–620.
- [Arya, 2006]: S. K. Arya; A. Chaubey; B. D. Malhotra, *Proc Indian Natn Sci Acad.* 72 (2006) 249–266.
- [Asaga, 2011]: S. Asaga; C. Kuo; T. Nguyen; M. Terpenning; A. E. Giuliano; D. S. Hoon, *Clin Chem.* 57 (2011) 84–91.
- [Asghari, 2018]: F. Asghari; N. Haghnava; D. Shanebandi; V. Khaze; B. Baradaran; T. Kazemi, *Adv Clin Exp Med.* 27 (2018) 941–945.
- [Astudillo de la Vega, 2014]: H. Astudillo de la Vega; É., Ruiz-García; D. Muñoz-González; J. Barajas-Figueroa; J. M. Lázaro-León; H. A. Maldonado-Martínez; V. Valero, *Rev Mex Mastol.* 4 (2014) 9–17.
- [Aydin, 2015]: S. Aydin, *Peptides* 72 (2015) 4–15.
- [Aydin, 2017]: E. B. Aydin; M. K. Sezgentürk, *Talanta* 172 (2017) 162–170.

B

- [Badr, 2016]: F. M. Badr, *JSM Biotechnol Bioeng.* 3 (2016) 1068.
- [Bahadir, 2014]: E. B. Bahadir; M. K. Sezgentürk, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 44 (2014) 248–262.
- [Bakke, 2000]: A. C. Bakke, *Laboratory Medicine* 31 (2000) 91–104.
- [Bakke, 2001]: A. C. Bakke, *Laboratory Medicine* 32 (2001) 207–211.
- [Ballehaninna, 2012]: U. K. Ballehaninna; R. S. Chamberlain, *J Gastrointest Oncol.* 3 (2012) 105–119.
- [Barbarotto, 2008]: E. Barbarotto; T. D. Schmittgen; G. A. Calin, *Int J Cancer.* 122 (2008) 969–977.
- [Barderas, 2012]: R. Barderas; I. Babel; R. Díaz-Uriarte; V. Moreno; A. Suárez; F. Bonilla; R. Villar-Vázquez; G. Capellá; J. I. Casal. *J Proteomics.* 75 (2012) 4647–4655.

- [Bartel, 2009]:** D. P. Bartel, *Cell* 136 (2009) 215–223.
- [Bartosik, 2016]:** M. Bartosik; H. Durikova; B. Vojtesek; M. Anton; E. Jandakova; R. Hrstka, *Biosens Bioelectron.* 83 (2016) 300–305.
- [Bartosik, 2018]:** M. Bartosik; L. Jirakova; M. Anton; B. Vojtesek; R. Hrstka, *Anal Chim Acta.* 1042 (2018) 37–43.
- [Becker, 1984]:** U. Becker; K. Bartl; A. W. Wahlefeld, *Thromb Res.* 35 (1984) 475–484.
- [Belousov, 2010]:** P.V. Belousov; D.V. Kuprash; S.A. Nedospasov; Y.V. Shebzukhov, *Curr Mol Med.* 10 (2010) 115–122.
- [Benes, 2010]:** V. Benes; M. Castoldi, *Methods* 50 (2010) 244–249.
- [Berezovski, 2003]:** M Berezovski; S. N. Krylov, *J Am Chem Soc.* 125 (2003) 13451–13454.
- [Bernard, 2004]:** M. P. Bernard; D. Cao; R. V. Myers; W. R. Moyle, *Anal. Biochem.* 327 (2004) 278–283.
- [Bertok, 2015]:** T. Bertok; A. Sediva; J. Filip; M. Ilcikova; P. Kasak; D. Velic; E. Jane; M. Mravcová; J. Rovenský; P. Kunzo, *Langmuir* 31 (2015) 7148–7157.
- [Betazzi, 2013]:** F. Betazzi; E. Hamid-Asl; C. L. Esposito; C. Quintavalle; N. Formisano; S. Laschi; S. Cartuogno; M. Iaboni; G. Marrazza; M. Mascini; L. Cerchia; V. De Franciscis; G. Condorelli; I. Palchetti, *Anal Bioanal Chem.* 405 (2013) 1025–1034.
- [Bhatt, 2010]:** A. N. Bhatt; R. Mathur; A. Farooque; A. Verma; B. S. Dwarakanath, *Indian J Med Res.* 132 (2010) 129–149.
- [Bi, 2017]:** S. Bi; S. Yue; S. Zhang, *Chem Soc Rev.* 46 (2017) 4281.
- [Bilitewski, 2006]:** U. Bilitewski, *Anal Chim Acta.* 568 (2006) 232–247.
- [Bisso, 2013]:** A. Bisso; M. Faleschini; F. Zampa; V. Capaci; J. De Santa; L. Santarpia L; S. Piazza; V. Cappelletti; M. Daidone; R. Agami; G. Del Sal, *Cell Cycle.* 12 (2013) 1679–1687.
- [Bjerner, 2005]:** J. Bjerner; K. H. Olsen; O. P. Børmer; K. Nustad, *Clin Biochem.* 38 (2005) 465–472.
- [Blokzijl, 2010]:** A. Blokzijl; M. Friedman; F. Pontén; U. Landegren, *J Intern Med.* 268 (2010) 232–245.
- [Bo, 2018]:** B. Bo; T. Zhang; Y. Jiang; H. Cui; P. Miao, *Anal Chem.* 90 (2018) 2395–2400.
- [Boguslawski, 1986]:** S. J. Boguslawski; D. E. Smith; M. A. Michalak; K. E. Mickelson; C. O. Yehle; W. L. Patterson; R. J. Carrico, *J Immunol Methods.* 89 (1986) 123–130.
- [Bohunicky, 2011]:** B. Bohunicky; S.A. Mousa, *Nanotechnol Sci Appl.* 4 (2011) 1–10.
- [Bowen, 2014]:** R. A. R. Bowen; A. T. Remaley, *Biochem Med (Zagreb).* 24 (2014) 31–44.
- [Briones, 2012]:** C. Briones; M. Moreno, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 3071–3089.

[Brown, 2002]: T. A. Brown. (2002). The Human Genome. En *Genomes*. Oxford. UK. Wiley-Liss.

[Buder, 2016]: A. Buder; C. Tomuta; M. Filipits, *Curr Opin Oncol*. 28 (2016) 130–134.

[Bui, 2018]: N. Q. Bui; S-W. Cho; M. S. Moorthy; S. M. Park; Z. Piao; S. Y. Nam; H, W. Kang; C-S. Kim; J. Oh, *Sci Rep*. 8 (2018). DOI:10.1038/s41598-018-20139-0.

[Bulaj, 2005]: G. Bulaj, *Biotechnol Adv*. 23 (2005) 89–92.

[Burge, 2014]: R. G. Burge; M. A. Martinez-Yamout; H. J. Dyson; P. E. Wright, *Biochemistry* 53 (2014) 1495–1510.

[Buxbaum, 2015]: E. Buxbaum. (2015). En *Fundamentals of protein structure and function*. Switzerland. Springer International Publishing.

C

[Camacho, 2007]: C. Camacho; J. C. Matías; B. Chico; R. Cao; L. Gómez; B. K. Simpson; R. Villalonga. *Electroanalysis* 19 (2007) 2538–2542.

[Campuzano, 2011^a]: S. Campuzano; M. Pedrero; J. L. García; E. García; P. García, J. M. Pingarrón; *Anal Bioanal Chem*. 399 (2011) 2413–2420.

[Campuzano, 2011^b]: S. Campuzano; F. Kuralay; M. J. Lobo-Castañón; M. Bartošík; K. Vyavahare; E. Paleček; D. A. Haake; J. Wang, *Biosens Bioelectron*. 26 (2011) 3577–3583.

[Campuzano, 2014^a]: S. Campuzano; V. Salema; M. Moreno-Guzmán; M. Gamella; P. Yáñez-Sedeño; L. A. Fernández; J.M. Pingarrón, *Biosens Bioelectron*. 52 (2014) 255–260.

[Campuzano, 2014^b]: S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez; E. López-Hernández; F. Conzuelo; R. Granados; J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón, *Angew Chem Int Ed Engl*. 53 (2014) 6168–6171.

[Campuzano, 2016]: S. Campuzano; M. Pedrero; J. M. Pingarrón, *Trends Analyt Chem*. 79 (2016) 335–343.

[Campuzano, 2017^a]: S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Sensors* 17 (2017) 866.

[Campuzano, 2017^b]: S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Chemosensors* 5 (2017) 8.

[Campuzano, 2017^c]: S. Campuzano; M. Pedrero; J. M. Pingarrón, *Sensors* 17 (2017) 1993.

[Campuzano, 2017^d]: S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Electrochim. Acta*. 230 (2017) 271–278.

[Campuzano, 2017^e]: S. Campuzano; M. Pedrero; J. M. Pingarrón. Electrochemical Nucleic Acid-Based Strategies for miRNAs Determination. En *Comprehensive Analytical Chemistry*. 77 (2017) Elsevier B.V.

- [Campuzano, 2017^f]: S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón. *Trends Analyt Chem.* 86 (2017) 14–24.
- [Cao, 2013]: Y. Cao; H. J. Kim; Y. Li; H. Kong; B. Lemieux, *Curr Protoc Mol Biol.* 104 (2013) DOI: 10.1002/0471142727.mb1511s104.
- [Cappelletti, 2015]: V. Cappelletti; V. Appierto, P. Tiberio; E. Fina; M. Callari; M. G. Daidone, *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2015 (2015) 60–63.
- [Cardoso, 2016]: A. R. Cardoso; F. T. C. Moreira; R. Fernandes; M. G. F. Sales, *Biosens Bioelectron.* 80 (2016) 621–630.
- [Carreón, 2012]: O. Z. Carreón; A. V. Mendiola; B. W. Steider; I. S. Cruz, *Rev Esp Cienc Salud.* 15 (2012) 15–25.
- [Castillo, 2013]: J. J. Castillo; W. E. Svendsen; N. Rozlosnik; P. Escobar; F. Martinez; J. Castillo-Leon, *Analyst* 138 (2013) 1026–1031.
- [Centi, 2007]: S. Centi; S. Tombelli; M. Minunni; M. Mascini, *Anal Chem.* 79 (2007) 1466–1473.
- [Chan, 2010]: H-M. Chan; L-S. Chan; R. N-S. Wong; H-W. Li, *Anal Chem.* 82 (2010) 6911–6918.
- [Chan, 2013]: D. Chan; S-C. Lee. (2013). Serial Changes in Expression of Proteins in Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. De *Oncogene and Cancer-From Bench to Clinic*. IntechOpen, DOI: 10.5772/3217.
- [Chatterjee, 2006]: M. Chatterjee; S. Draghici; M. A. Tainsky, *Curr Opin Drug Discov Devel.* 9 (2006) 380–385.
- [Chen, 1997]: Y-T. Chen; M. J. Scanla; U. Sahin; Ö. Türeci; A. O. Gure; S. Tsang; B. Williamson; E. Stockert; M. Pfreundschuh; L.J. Old, *Proc Natl Acad Sci.* 94 (1997) 1914–1918.
- [Chen, 2008]: S. Chen; R. Yuan; Y. Chai; Y. Xu; L. Min; N. Li, *Sens Actuators B Chem.* 135 (2008) 236–244.
- [Chen, 2011]: X. Chen; Y-H. Lin; J. Li; L-S. Lin; G-N. Chen; H-H. Yang, *Chem Commun.* 47 (2011) 12116–12118.
- [Chen, 2015]: H. Chen; D-P. Shen; Z-Z. Zhang; J-H. Liu; Y-Y. Shen; X-Z. Ni, *World J Gastroenterol.* 21 (2015) 1838–1844.
- [Chen, 2017]: G. Chen; M. Jin; P. Du; C. Zhang; X. Cui; Y. Zhang; J. Wang; F. Jin; Y. She; H. Shao; S. Wang; L. Zheng, *Food Agric Immunol.* 28 (2017) 315–327.
- [Chen, 2018^a]: Y-X. Chen; K-J. Huang; K-X. Niu, *Biosens Bioelectron.* 99 (2018) 612–624.
- [Chen, 2018^b]: Y-X. Chen; X. Wu; K-J. Huang, *Sens Actuators B Chem.* 270 (2018) 179–186.
- [Cheng, 2009]: J. Cheng; R. Koukiekolo; K. Kieliszewicz; S. M. Sagan; J. P. Pezacki, *Biochim Biophys Acta.* 1794 (2009) 1197–1203.

[Cheng, 2016]: F. F. Cheng; N. Jiang; X. Li; L. Zhang; L. Hu; X. Chen; L. P. Jiang; E. S. Abdel-Halim; J. J. Zhu, *Biosens Bioelectron.* 85 (2016) 891–896.

[Chikkaveeraiah, 2012]: B. V. Chikkaveeraiah; A. Bhirde; N. Y. Morgan; H. S. Eden; X. Chen, *ACS Nano.* 28 (2012) 6546–6561.

[Cho, 2012]: W. C. Cho, *Expert Rev Mol Diagn.* 12 (2012) 315–318.

[Cho, 2017]: S. H. Cho; C. S. Hong; H. N. Kim; M. H. Shin; K. R. Kim; H. J. Shim; J. E. Hwang; W. K. Bae; I. J. Chung, *Cancer Res Treat.* 49 (2017) 766–777.

[Cho, 2018]: I. H. Cho; J. Lee; J. Kim; M. S. Kang; J. K. Paik; S. Ku; H. M. Cho; J. Irudayaraj; D. H. Kim, *Sensors* 18 (2018). DOI: 10.3390/s18010207.

[Choe, 2016]: W. Choe; T. A. Durgannavar; S. J. Chung, *Materials* 9 (2016) 994.

[Choudhuri, 2010]: S. Choudhuri, *J Biochem Mol Toxicol.* 24 (2010) 195–216.

[Chugh, 2012]: P. Chugh; D. P. Dittmer, *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 3 (2012) 601–616.

[Cissell, 2007]: K. A. Cissell; S. Shrestha; S. S. K. Deo, *Anal Chem.* 79 (2007) 4754–4761.

[Cissell, 2008]: K. A. Cissell; Y. Rahimi; S. Shrestha; E. A. Hunt; S. K. Deo, *Anal Chem.* 80 (2008) 2319–2325.

[Ciui, 2017]: B. Ciui; D. Jambrec; R. Sandulescu; C. Cristea, *Current Opinion in Electrochemistry* 5 (2017) 183–192.

[Conzuelo, 2012]: F. Conzuelo; M. Gamella; S. Campuzano; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Anal Chim Acta.* 737 (2012) 29–36.

[Conzuelo, 2014]: F. Conzuelo; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; M. Gamella; R. M. Torrente-Rodríguez; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Anal Chim Acta.* 820 (2014) 32–38.

[Cosnier, 1999]: S. Cosnier, *Biosens Bioelectron.* (1999) 14 443–456.

[Costa, 2013]: P. M. Costa; M. C. Pedroso de Lima, *Pharmaceuticals* 6 (2013) 1195–1220.

[Cremoux, 2003]: P. de Cremoux; C. Tran-Perennou; B. L. Brockdorff; E. Boudou; N. Brînnér; H. Magdelénat; A. E. Lykkesfeldt, *Endocr Relat Cancer.* 10 (2003) 409–418.

[Crowley, 2013]: E. Crowley; F. Di Nicolantonio; F. Loupakis; A. Bardelli. *Nat Rev Clin Oncol.* 10 (2013) 472–484.

D

[Dacarro, 2018]: G. Dacarro; A. Taglietti; P. Pallavicini, *Molecules* 23 (2018). DOI: 10.3390/molecules23061414.

[Dai, 2015]: X. Dai; T. Li; Z. Bai; Y. Yang; X. Liu; J. Zhan; B. Shi, *Am J Cancer Res.* 5 (2015) 2929–2943.

- [Dallas, 2008]: N. A. Dallas; S. Samuel; L. Xia; F. Fan; Mm J. Gray; S. J. Lim; L. M. Ellis, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 1931–1937.
- [Danczyk, 2003]: R. Danczyk; B. Krieder; A. North; T. Webster; H. HogenEsch; A. Rundell, *Biotechnol Bioeng.* 84 (2003) 215–223.
- [Daneshpour, 2018]: M. Daneshpour; B. Karimi; K. Omidfar, *Biosens Bioelectron.* 109 (2018) 197–205.
- [Danielson, 2013]: D. C. Danielson; J. P. Pezacki, *FEBS Lett.* 587 (2013) 1198–1205.
- [Darmanis, 2016]: S. Darmanis; C. J. Gallant; V. D. Marinescu; M. Niklasson; A. Segerman; G. Flamourakis; S. Fredriksson; E. Assarsson; M. Lundberg; S. Nelander; B. Westermark; U. Landegren, *Cell Rep.* 14 (2016) 380–389.
- [de Dios, 2010]: A. S. de Dios; M. E. Díaz-García, *Anal Chim Acta.* 666 (2010) 1–22.
- [de Matos, 2010]: L. L. de Matos; D. C. Trufelli; M. G. L. de Matos; M. A. da Silva Pinhal, *Biomark Insights.* 5 (2010) 9–20.
- [Debasis, 2011]: D. Samanta; A. Sarkar, *Chem Soc Rev.* 40 (2011) 2567–2592.
- [Degliangeli, 2014]: F. Degliangeli; P. P. Pompa; R. Fiammengio, *Chemistry* 20 (2014) 9476–9492.
- [Denli, 2004]: A. M. Denli; B. B. Tops; R. H. Plasterk; R. F. Ketting; G. J. Hannon, *Nature* 432 (2004) 231–235.
- [Díez, 2012]: A. C. V. Díez (2012). *Estudio del mecanismo de liberación de endoglina soluble y su relevancia en homeostasis vascular.* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.
- [Díez, 2014]: P. Díez; M. Gamella; P. Martínez-Ruiz; V. Lanzone; A. Sánchez; E. Sánchez; B. Garcinuño; R. Villalonga; J. M. Pingarrón, *ChemElectroChem.* 1 (2014) 200–206.
- [Dincer, 2017]: C. Dincer; R. Bruch; A. Kling; P. S. Dittrich; G. A. Urban, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 728–742.
- [Dinis-Oliveira, 2014]: R. J. Dinis-Oliveira, *Bioanalysis* 6 (2014) 2877–2896.
- [Dirks, 2004]: R. M Dirks; N. A. Pierce, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 15275–15278.
- [Djuranovic, 2011]: S. Djuranovic; A. Nahvi; R. Green, *Science* 331 (2011) 550–553.
- [Doldán, 2016]: X. Doldán; P. Fagúndez; A. Cayota; J. Laíz; J. P. Tosar, *Anal Chem.* 88 (2016) 10466–10473.
- [Dominguez, 2012]: R. B. Dominguez; A. Hayat; A. Sassolas; G. A. Alonso; R. Munoz; J. L. Marty, *Talanta* 99 (2012) 232–237.
- [Dong, 2013]: H. Dong; J. Lei; Y. Wen; H. Ju; X. Zhang, *Chem Rev.* 113 (2013) 6207–6233.

[Dong, 2015]: S. Dong; R. Zhao; J. Zhu; X. Lu; Y. Li; S. Qiu; L. Jia; X. Jiao; S. Song; C. Fan; R. Hao; H. Song, *ACS Appl Mater Interfaces*. 7 (2015) 8834–8842.

[Doria, 2012]: G. Doria; J. Conde; B. Veigas; L. Giestas; C. Almeida; M. Assunção; J. Rosa; P. V. Baptista, *Sensors* 12 (2012) 1657–1687.

[Du, 2005]: T. Du; P.D. Zamore, *Development* 132 (2005) 4645–4652.

[Du, 2013]: F. L. Du; N. T. Ueno; A. M. González-Angulo, *Curr Breast Cancer Rep*. 5 (2013) DOI: 10.1007/s12609-013-0125-9.

[Du, 2017]: Y. Du; S. Dong, *Anal Chem*. 89 (2017) 189–215.

[Dudas, 2010]: S. P. Dudas; M. Chatterjee; M. A. Tainsky, *Cancer Biomark*. 6 (2010) 252–270.

[Duffy, 2017]: M. J. Duffy; N. Harbeck; M. Nap; R. Molina; A. Nicolini; E. Senkus; F. Cardoso, *Eur J Cancer*. 75 (2017) 284–298.

[Dutta, 2004]: P. K. Dutta; J. Dutta; V. S. Tripathi, *JSIR*. 63 (2004) 20–31.

E

[Ebhardt, 2010]: H. A. Ebhardt; A. Fedynak; R. P. Fahlman, *Silence* 1 (2010) 12.

[Eguílaz, 2010]: M. Eguílaz; M. Moreno-Guzmán; S. Campuzano; A. González-Cortés; P. Yañez-Sedeño; J. M. Pingarrón. *Biosens Bioelectron*. 26 (2010) 517–522.

[Eletxigerra, 2014]: U. Eletxigerra; J. M.-Perdiguerro; S. Merino; R. Villalonga; J. M. Pingarrón; S. Campuzano, *Anal Chim Acta*. 838 (2014) 37–44.

[Eletxigerra, 2016^a]: U. Eletxigerra; J. Martinez-Perdiguerro; S. Merino; R. Barderas; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. Villalonga; J. M. Pingarrón; S. Campuzano, *Sens Biosensing Res*. 7 (2016) 71–76.

[Eletxigerra, 2016^b]: U. Eletxigerra; J. Martinez-Perdiguerro; S. Merino; R. Barderas; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. Villalonga; J. M. Pingarrón; S. Campuzano, *Electroanalysis* 28 (2016) 1787–1794.

[Elgamal, 2013]: O. A. Elgamal; J. K. Park; Y. Gusev; A. C. Azevedo-Pouly; J. Jiang; A. Roopra; T. D. Schmittgen, *PLoS One*. 8 (2013) e76402.

[Elkon, 2008]: K. Elkon; P. Casali, *Nat Clin Pract Rheumatol*. 4 (2008) 491–498.

[Elshafey, 2013]: R. Elshafey; A. C. Tavares; M. Siaj; M. Zourob, *Biosens Bioelectron*. 50 (2013) 143–149.

[Elshafey, 2016]: R. Elshafey; M. Siaj; A.C. Tavares, *Analyst* 141 (2016) 2733–2740.

[Emami, 2014]: M. Emami; M. Shamsipur; R. Saber; R. Irajirad, *Analyst* 139 (2014) 2858–2866.

[England, 2015]: G. C. England; H. Luo; W. Cai, *Bioconjug Chem*. 26 (2015) 975–986.

- [Escamilla-Gómez, 2008]:** V. Escamilla-Gómez; S. Campuzano; M. Pedrero; J. M. Pingarrón. *Anal Bioanal Chem.* 391 (2008) 837–845.
- [Escamilla-Gómez, 2009]:** V. Escamilla-Gómez; D. Hernández-Santos; M. B. González-García; J. M. Pingarrón-Carrazón; A. Costa-García, *Biosens Bioelectron.* 24 (2009) 2678–2683.
- [Esquela-Kerscher, 2006]:** A. Esquela-Kerscher; F. J. Slack, *Nat Rev Cancer.* 6 (2006) 256–269.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2012]:** B. Esteban-Fernández de Ávila; M. Pedrero; S. Campuzano; V. Escamilla-Gómez; J. M. Pingarrón, *Anal Bioanal Chem.* 403 (2012) 917–925.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2013]:** B. Esteban-Fernández de Ávila; V. Escamilla-Gómez; S. Campuzano; M. Pedrero; J.- Pablo Salvador; M. -Pilar Marco; J. M. Pingarrón, *Sens Actuators B Chem.* 188 (2013) 212–220.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2014]:** B. Esteban-Fernández de Ávila; V. Escamilla-Gómez; V. Lanzone; S. Campuzano; M. Pedrero; D. Compagnone; J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* (2014) 26, 254–261.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2015]:** B. Esteban-Fernández de Ávila; E. Araque; S. Campuzano; M. Pedrero; B. Dalkiran; R. Barderas; R. Villalonga; E. Kiliç; J. M. Pingarrón, *Anal Chem.* 87 (2015) 2290–2298.
- [Esteller, 2011]:** M. Esteller, *Nat Rev Genet.* 12 (2011) 861–874.
- [Eto, 2014]:** K. Eto; M. Iwatsuki; M. Watanabe; S. Ida; T. Ishimoto; S. Iwagami; Y. Baba; Y. Sakamoto; Y. Miyamoto; N. Yoshida; H. Baba, *Ann Surg Oncol.* 21 (2014) 343–350.
- [Everson, 2017]:** E. T. S. G. da Silva; D. E. P. Souto; J. T. C. Barragan; J. F. Giarola; A. C. M. de Moraes; L. T, Kubota, *ChemElectroChem.* 4 (2017) 778–794.

F

- [Fang, 2006]:** S. Fang; H. J. Lee; A. W. Wark; R. M. Corn, *J Am Chem Soc.* 128 (2006) 14044–10446.
- [Fang, 2009]:** Z. Fang; S. O. Kelley, *Anal. Chem.* 81 (2009) 612–617.
- [Fang, 2014]:** X. Feng; Z. Wang; R. Fillmore; Y. Xi, *Cancer Lett.* 344 (2014) 166–173.
- [Fang, 2017]:** C. S. Fang; K-s. Kim; B. Yu; S. Jon; M-S. Kim; H. Yang, *Anal Chem.* 89 (2017) 2024–2031.
- [Farka, 2018]:** Z. Farka; V. Čunderlová; V. Horačková; M. Pastucha; Z. Mikušová; A. Hlaváček; P. Skládal, *Anal Chem.* 90 (2018) 2348–2354.
- [Farzin, 2018]:** L. Farzin; M. Shamsipur, *J Pharm Biomed Anal.* 147 (2018) 185–210.
- [Fehm, 2004]:** T. Fehm; W. Jäger; S. Krämer; C. Sohn; E. Solomayer; D. Wallwiener; G. Gebauer, *Anticancer Res.* 24 (2004) 1987–1992.

[Feng, 2016]: X. Feng; N. Gan; H. Zhang; T. Li; Y. Cao; F. Hu; Q. Jiang, *Biosens Bioelectron.* 75 (2016) 304–314.

[Fereja, 2013]: T. H. Fereja; A. Hymete; T. Gunasekaran, *ISRN Spectroscopy.* 2013 (2013) 1–12.

[Florea, 2015]: A. Florea; A. Ravalli; C. Cristea; R. Sandulescu; G. Marrazza, *Electroanalysis* 27 (2015) 1594–1601.

[Fornier, 2005]: M. N. Fornier; A. D. Seidman; M. K. Schwartz; F. Ghani; R. Thiel; L. Norton; C. Hudis, *Annals of Oncology* 16 (2005) 234–239.

[Fosså, 2004]: A. Fosså; A. Berner; S. D. Fosså; E. Hernes; G. Gaudernack; E. B. Smeland, *Prostate* 59 (2004) 440–447.

[Fowler, 2008]: J. M. Fowler; D. K. Y. Wong; H. B. Halsall, H; W. R. Heineman. (2008). Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. En X. Zhang (Ed.); H. Ju (Ed.); J. Wang (Ed.). *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. pp. 115–143. Amsterdam, Boston: Academic Press.

[Freudenberg, 2009]: J. A. Freudenberg; Q. Wang; M. Katsumata; J. Drebin; I. Nagatomo; M. I. Greene, *Exp Mol Pathol.* 87 (2009) 1–11.

[Fu, 2016]: G. Fu; S. T. Sanjay; X. Li, *Analyst* 141 (2016) 3883–3889.

[Fujita, 2009]: K. Fujita; C. M. Ewing; D. Y. S. Chan; L. A. Mangold; A. W. Partin; W. B. Isaacs; C. P. Pavlovich, *Int J Cancer.* 124 (2009) 664–669.

G

[Gabos, 2006]: Z. Gabos; R. Sinha; J. Hanson; N. Chauhan; J. Hugh; J. R. Mackey; B. Abdulkarim, *J Clin Oncol.* 24 (2006) 5658–5663.

[Gallo, 2015]: L. H. Gallo; K. N. Nelson; A. N. Meyer; D. J. Donoghue, *Cytokine Growth Factor Rev.* 26 (2015) 425–449.

[Gam, 2012]: L-H. Gam, *World J Exp Med.* 2 (2012) 86–91.

[Gamella, 2012]: M. Gamella; S. Campuzano; F. Conzuelo; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Electroanalysis.* 24 (2012) 2235–2243.

[Gan, 2013]: S. D. Gan; K. R. Patel, *J Invest Dermatol.* 133 (2013) e12.

[Gao, 2006]: D. Gao; N. McBean; J. S. Schultz; Y. Yan; A. Mulchandani; W. Chen, *J Am Chem Soc.* 128 (2006) 676–677.

[Gao, 2017]: A. Gao; X. Yang; J. Tong; L. Zhou; Y. Wang; J. Zhao; H. Mao; T. Lia, *Biosens Bioelectron.* 91 (2017) 482–488.

[Garranzo-Asensio, 2016]: M. Garranzo-Asensio; A. Guzman-Aranguez; C. Povés; M. J. Fernández-Aceñero; R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; G. Domínguez; L.

San Frutos; N. Rodríguez; M. Villalba; J. M. Pingarrón; S. Campuzano; R. Barderas. *Anal Chem.* 88 (2016) 12339–12345.

[Garzon, 2006]: R. Garzon; M. Fabbri; A. Cimmino; G. A. Calin; C. M. Croce, *Trends Mol Med.* 12 (2006) 580–587.

[Ge, 2014]: Z. Ge; M. Lin; P. Wang; H. Pei; J. Yan; J. Shi; Q. Huang; D. He; C. Fan; X. Zuo, *Anal Chem.* 86 (2014) 2124–2130.

[Ge, 2016]: X. Ge; A. Zhang; Y. Lin; D. Du, *Biosens Bioelectron.* 80 (2016) 201–207.

[Ghazizadeh, 2018]: E. Ghazizadeh; R. K. Oskuee; M. R. Jaafari; S. Hosseinkhani, *Sci Rep.* 8 (2018) 3786.

[Ghosh, 2017]: S. Ghosh; S. Srivastava (2017). Nuts and Bolts of Biomarkers Research. En S. Srivastava (Ed.). *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection*. West Sussex, UK, John Wiley & Sons, Ltd.

[Giannetto, 2011]: M. Giannetto; L. Elviri; M. Careri; A. Mangia; G. Mori, *Biosens Bioelectron.* 26 (2011) 2232–2236.

[Gizeli, 1996]: E. Gizeli; C. R. Lowe, *Curr Opin Biotechnol.* 7 (1996) 66–71.

[Golchin, 2017]: J. Golchin; K. Golchin; N. Alidadian; S. Ghaderi; S. Eslamkhah; A. Akbarzadeh, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 45 (2017) 1–8.

[Gómez, 2010]: M. C. M. Gómez; M. B. González. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.1066>.

[Gómez, 2015]: L. J. V. Gómez; I. E. S. Mercado; M. H. H. Gómez; R. G. Giralardi, *Biol Med (Aligarh) J. S2* (2015). DOI:10.4172/0974-8369.S2-005.

[Gómez, 2016]: E. N. Gómez (2016). *Las isoformas de endoglina en la regulación de la angiogénesis*. (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca. Castilla y León. España.

[Gong, 2011]: C. Gong; Y. Yao; Y. Wang; B. Liu; W. Wu; J. Chen; F. Su; H. Yao; E. Song, *J Biol Chem.* 286 (2011) 19127–19137.

[Gong, 2015]: L. Gong; Z. Zhao; Y-F. Lv; S-Y. Huan; T. Fu; X-B. Zhang; G-L. Shen; R-Q. Yu, *Chem Commun.* 51 (2015) 979–995.

[Goossens, 2015]: N. Goossens; S. Nakagawa; X. Sun; Y. Hoshida, *Transl Cancer Res.* 4 (2015) 256–269.

[Graves, 2012]: P. Graves; Y. Zeng, *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10 (2012) 239–245.

[Greenwood, 2015]: C. Greenwood; D. Ruff; S. Kirvell; G. Johnson; H. S. Dhillon; S. A. Bustin, *Biomolecular detection and quantification* 4 (2015) 10–16.

[Grieshaber, 2008]: D. Grieshaber; R. MacKenzie; J. Vörös; E. Reimhult, *Sensors* 8 (2008) 1400–1458.

- [Großhans, 2008]:** H. Großhans; W. Filipowicz, *Nature* 451(2008) 414–416.
- [Güemes, 2015]:** M. Güemes; S. A. Rahman; K. Hussain, *Arch Dis Child*. 0 (2015) 1–6.
- [Guerrero, 2015]:** S. Guerrero; G. Martínez-García; V. Serafín; L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Analyst* 140 (2015) 7527–7533.
- [Gupta, 2016]:** N. Gupta; R. Gupta; A. K. Acharya; B. Patthi; V. Goud; S. Reddy; A. Garg; A. Singla, *Nepal J Epidemiol*. 6 (2016) 613–619.
- [Güven, 2014]:** E. Güven; K. Duus; M. C. Lydolph; C. S. Jørgensen; I. Laursen, G. Houen, *J Immunol Methods*. 403 (2014) 26–36.

H

- [Ha, 2007]:** T. H. Ha; S. O. Jung; J. M. Lee; K. Y. Lee; Y. Lee; J. S. Park; B. H. Chung, *Anal Chem*. 79 (2007) 546–556.
- [Haas, 2016]:** G. Haas; S. Cetin; M. Messmer; B. C-W-Ming; O. Terenzi; J. Chicher; L. Kuhn; P. Hammann; S. Pfeffer, *Nucleic Acids Res*. 44 (2016) 2873–2887.
- [Haidopoulos, 2000]:** D. Haidopoulos; M. M. Konstadoulakis; P. T. Antonakis, D. G. Alexiou; A. M. Manouras; S. M. Katsaragakis; G. F. Androulakis, *Eur J Surg Oncol*. 26 (2000) 742–746.
- [Hallinan, 2016]:** N. Hallinan; S. Finn; S. Cuffe; S. Rafee; K. O'Byrne; K. Gately, *Cancer Treat Rev*. 46 (2016) 51–62.
- [Hamam, 2017]:** R. Hamam; D. Hamam; K. A. Alsaleh; M. Kassem; W. Zaher; M. Alfayez; A. Aldahmash; N. M. Alajez, *Cell Death Dis*. 8 (2017). DOI: 10.1038/cddis.2017.440.
- [Hamanaka, 2003]:** Y. Hamanaka; Y. Suehiro; M. Fukui; K. Shikichi; K. Imai; Y. Hinoda, *Int J Cancer*. 103 (2003) 97–100.
- [Hammond, 2016]:** J. Hammond; N. Formisano; P. Estrela; S. Carrara; J. Tkac, *Essays Biochem*. 60 (2016) 69–80.
- [Han, 2015]:** D. Han; C. Wu; M. You; T. Zhang; S. Wan; T. Chen; L. Qiu; Z. Zheng; H. Liang; W. Tan, *Nat Chem*. 7 (2015) 835–841.
- [Han, 2017^a]:** X. Han; J. Wang; Y. Sun, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 15 (2017) 59–72.
- [Han, 2017^b]:** L. Han; W. Wang; W. Ding; L. Zhang, *J Cell Mol Med*. 21 (2017) 2000–2008.
- [Hanahan, 2000]:** D. Hanahan; R. A. Weinberg, *Cell* 100 (2000) 57–70.
- [Hanash, 2003]:** S. Hanash, *Nat Biotechnol*. 21 (2003) 37–38.
- [Hanash, 2008]:** S. M. Hanash; S. J. Pitteri; V. M. Faca, *Nature*. 452 (2008) 571–579.
- [Hanash, 2011]:** S. Hanash; A. Taguchi, *Cancer J*. 17 (2011) 423–428.

- [Hansen, 2007]: T. Hansen; L. Olsen; M. Lindow; K. D. Jakobsen; H. Ullum; E. Jonsson; O. A. Andreassen; S. Djurovic; I. Melle; I. Agartz; H. Hall; S. Timm; A. G. Wang; T. Werge, *PLoS One*. 2 (2007) e873.
- [Hartman, 2013]: M. R. Hartman; R. C. H. Ruiz; S. Hamada; C. Xu; K. G. Yancey; Y. Yu; W. Han; D. Luo, *Nanoscale* 5 (2013) 10141–10154.
- [Hasheesh, 2010]: N. M. Hasheesh; M. Waly; M. Gouda; N. El Taweel, *Med J Cairo Univ*. 78 (2010) 117–121.
- [Hata, 2015]: A. Hata; J. Lieberman, *Sci Signal*. 8 (2015) DOI: 10.1126/scisignal.2005825.
- [Hayat, 2014]: A. Hayat; J. L. Marty, *Sensors* 14 (2014) 10432–10453.
- [Hayes, 2014]: J. Hayes; P. P. Peruzzi; S. Lawler, *Trends Mol Med*. 20 (2014) 460–469.
- [Henderson, 2016]: M. C. Henderson; A. B. Hollingsworth; K. Gordon; M. Silver; R. Mulpuri; E. Letsios; D. E. Reese, *PLoS One*. 11 (2016) e0157692.
- [Henry, 2012]: N. L. Henry; D. F. Hayes, *Mol Oncol*. 6 (2012) 140–146.
- [Heo, 2012]: C. K. Heo; Y.Y. Bahk; E. W. Cho, *BMB Rep*. 45 (2012) 677–685.
- [Hermanson, 2008]: G. T. Hermanson. (2008). En *Bioconjugate Techniques*. Academic Press.
- [Hernando, 2007]: E. Hernando, *Clin Transl Oncol*. 9 (2007) 155–160.
- [Hervas, 2011]: M. Hervas; M. A. Lopez; A. Escarpa, *Analyst* 136 (2011) 2131–2138.
- [Heywang-Köbrunner, 2011]: S. H. Heywang-Köbrunner; A. Hacker; S. Sedlacek, *Breast Care* 6 (2011) 199–207.
- [Hezova, 2016]: R. Hezova; A. Kovarikova; J. Srovnal; M. Zemanova; T. Harustiak; J. Ehrmann; M. Hajduch; M. Sachlova; M. Svoboda; O. Slaby, *Tumor Biol*. 37 (2016) 8007–8018.
- [Hirschmann, 2012]: A. Hirschmann; T. A. Lamb; G. Marchal; M. Padilla M; J. Diebold, *Am J Clin Pathol*. 138 (2012) 837–844.
- [Hoffman, 2014]: H. A. Hoffman; L. Chakrabarti; M. F. Dumont; A. D. Sandler; R. Fernandes, *RSC Adv*. 4 (2014) 29729.
- [Hoffmann, 1988]: J. J. M. L. Hoffmann, M. A. Verhappen, *Clin Chem*. 34 (1988) 2135–2140.
- [Holzinger, 2014]: M. Holzinger; A. L. Goff; S. Cosnier, *Front Chem*. 2 (2014) 63.
- [Hon, 2016]: J. D. C. Hon; B. Singh; A. Sahin; G. Du; J. Wang; V. Y. Wang; F-M. Deng; D. Y. Zhang; M. E. Monaco; P. Lee, *Am J Cancer Res*. 6 (2016) 1864–1872.
- [Hong, 2013]: C-Y. Hong; X. Chen; T. Liu; J. Li; H-H. Yang; J-H. Chen; G-N. Chen, *Biosens Bioelectron*. 50 (2013) 132–136.
- [Hong, 2016^a]: W. Hong; S. Lee; E. J. Kim; M. Lee; Y. Cho, *Biosens Bioelectron*. 75 (2016) 181–186.

- [Hong, 2016^b]: W. Hong; S. Lee; Y. Cho, *Biosens Bioelectron.* 86 (2016) 920–926.
- [Hu, 2017]: R. Hu; G. Wang; R. Yuan; Y. Xu; T. Yu; L. Zhong; Q. Zhou; S. Ding, *J Electroanal Chem.* 789 (2017) 160–166.
- [Hu, 2018]: F. Hu; W. Zhang; J. Zhang; Q. Zhang; T. Sheng; Y. Gu, *Sens Actuators B Chem.* 271 (2018) 15–23.
- [Huang, 2011]: Y. Huang; X. J. Shen; Q. Zou; S. P. Wang; S. M. Tang; G. Z. Zhang, *J Physiol Biochem.* 67 (2011) 129–139.
- [Huang, 2015]: P. Huang; B. Ye; Y. Yang; J. Shi; H. Zhao, *Tumor Biol.* 36 (2015) 3381–3387.
- [Hug, 2015]: K. A. Hug; L. Anthony; D. Eldeiry; J. Benson; E. Wheeler; S. Mousa; B. Shi, *Anticancer Res.* 35 (2015) 3175–3183.
- [Hulanicki, 1991]: A. Hulanicki; S. Glab; F. Ingman, *Pure & App. Chem.* 63 (1991) 1247–1250.
- [Hünefeld, 2013]: C. Hünefeld; M. Mezger; J.S. Kern; A. Nysytöm; K. Brickner-Tuderman; I. Müller; R. Handgretinger; M. Röcken. *Exp Dermat.* 22 (2013) 162–167.
- I
- [Ikbal, 2015]: J. Ikbal G. S. Lim, Z. Gao, *Trends Analyt Chem.* 64 (2015) 86–99.
- [Ilkhani, 2016]: H. Ilkhani; A. Ravalli; G. Marrazza, *Chemosensors* 4 (2016) 23.
- [Ilyin, 2004]: S. E. Ilyin; S. M. Belkowski; C. R. Plata-Salamán, *Trends Biotechnol.* 22 (2004) 411–416.
- [Inokuchi, 2017]: M. Inokuchi; H. Murase; S. Otsuki; T. Kawano; K. Kojima, *World J Surg Oncol.* 15 (2017) 2. DOI: 10.1186/s12957-016-1081-4.
- [Ipenburg, 2016]: N. A. Ipenburg; K. Koole; K. S. Liem; P. M. W. van Kempen; P. Koole; P. J. van Diest; R. J. J. van Es; S. M. Willems, *Targ Oncol.* 11 (2016) 17–27.
- [Iqbal, 2012]: M. A. Iqbal; S. G. Gupta; S. S. Hussaini, *ABR* 3 (2012) 158–163.
- [Iqbal, 2014]: N. Iqbal; N. Iqbal, *Mol Biol Int.* 2014 (2014).
- [Islam, 2017]: N. Islam; M. K. Masud; H. Haque; S. Al Hossain; Y. Yamauchi; N-T. Nguyen; M. J. A. Shiddiky, *Small Methods.* 1 (2017) DOI: 10.1002/smt.201700131.
- [Iuchi, 2001]: S. Iuchi, *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 58 (2001) 625–635.
- [Ivanova, 2003]: E. V. Ivanova; V. S. Sergeeva; J. Oni; C. Kurzawa; A. D. Ryabov; W. Schuhmann, *Bioelectrochemistry* 60 (2003) 65–71.
- [Iwamuro, 2015]: M. Iwamuro; Y. Kawai; T. Matsumoto; M. Uda; H. Okada, *Ecancermedicalscience.* 9 (2015) 560.

J

[Jain, 2005]: J. L. Jain. (2005). Biosynthesis of proteins. En *Fundamentals of Biochemistry*. Ran Nagar, New Delhi. S. Chand & Company Ltd.

[Jansson, 2012]: M. D. Jansson; H. A. Lund, *Mol Oncol.* 6 (2012) 590–610.

[Järås, 2011]: K. Järås; K. Anderson, *Expert Rev. Proteomics* 8 (2011) 577–589.

[Jaroszeski, 1999]: M. J. Jaroszeski; G. Radcliff, *Mol Biotechnol.* 11 (1999) 37–53.

[Jayanthi, 2017]: V.S.P.K.S.A. Jayanthi; A. B. Das; U. Saxena, *Biosens Bioelectron.* 15 (2017) 15–23.

[Jensen, 2011]: G. C. Jensen; C. E. Krause; G. A. Sotzing; J. F. Rusling, *Phys Chem Chem Phys.* 13 (2011) 4888–4894.

[Jeong, 2016]: S. Jeong; J. Park; D. Pathania; C. M. Castro; R. Weissleder; H. Lee, *ACS Nano* 10 (2016) 1802–1809.

[Jin, 2010]: J. Jin; M. Cid; C. B. Poole; L. A. McReynolds, *Biotechniques* 48 (2010) DOI: 10.2144/000113364.

[Jin, 2014]: J. Jin; L. A. McReynolds; M. Gullerova, *Methods Mol Biol.* 1173 (2014) 99–111.

[Jinling, 2017]: W. Jinling; S. Sijing; Z. Jie; W. Guinian, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 45 (2017) 1–6.

[John, 2004]: M. A. S. John; Y. Li; X. Zhou; P. Denny; C. M. Ho; C. Montemagno; W. Shi; F. Qi; B. Wu; U. Sinha; R. Jordan; L. Wolinsky; N. H. Park; H. Liu; E. Abemayor; D. T. Wong, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 130 (2004) 929–935.

[Johnson, 2014]: B. N Johnson; R. Mutharasan, *Analyst* 139 (2014) 1576–1588.

[Jones, 2010]: D. P. Jones. (2010) *Biomedical sensors*. New York: Momentum Press.

[Joy, 2005]: J. E. Joy; E. E. Penhoet; D. B. Petitti. (2005). *Saving Women's Lives: Strategies for Improving Breast Cancer Detection and Diagnosis*. Washington. US. National Academies Press.

[Jung, 2007]: Y. Jung; J. M. Lee; H. Jung; B. H. Chung, *Anal Chem.* 79 (2007) 6534–6541.

[Justino, 2015]: C. I. L. Justino; A. C. Duarte; T. A. P. Rocha-Santos, *Trends Analyt Chem.* 65 (2015) 73–82.

K

[Kabel, 2017]: A. M. Kabel, *J Oncol Sci.* 3 (2017) 5–11.

[Kaçar, 2015]: C. Kaçar; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Pedrero; S. Campuzano; E. Kilic; J. M. Pingarrón, *Microchim Acta.* 182 (2015) 1457–1464.

- [Kamel, 2016]:** H. F. M. Kamel; H. S. B. Al-Amodi. (2016). Cancer Biomarkers. En M. Wang (Ed.); F. A. Witzmann (Ed.). *Role of Biomarkers in Medicine*. IntechOpen, DOI: 10.5772/62421.
- [Kapralov, 2009]:** A. Kapralov; I. I. Vlasova; W. Feng; A. Maeda; K. Walson; V. A. Tyurin; Z. Huang; R. K. Aneja; J. Carcillo; H. Bayir; V. E. Kagan, *J Biol Chem*. 284 (2009) 30395–30407.
- [Karam, 2008]:** J. A. Karam; R. S. Svatek; P. Karakiewicz; A. Gallina; C. G. Roehrborn; K. M. Slawin; S. F. Shariat, *Clin Cancer Res*. 14 (2008) 1418–1422.
- [Karimzadeh, 2018]:** A. Karimzadeh; M. Hasanzadeh; N. Shadjou; M. de la Guardia, *Trends Analyt Chem*. 107 (2018) 1–20.
- [Katchman, 2016]:** B. A. Katchman; R. Barderas; R. Alam; D. Chowell; M. S. Field; L. J. Esserman; G. Wallstrom; J. LaBaer; D. W. Cramer; M. A. Hollingsworth; K. S. Anderson, *Proteomics Clin Appl*. 10 (2016) 720–731.
- [Kavosi, 2014]:** B. Kavosi; A. Salimi; R. Hallaj; K. Amani, *Biosens Bioelectron*. 52 (2014) 20–28.
- [Kelly, 2009]:** R. S. Kelly, *Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts* (2009). <http://jasdl.asdlib.org/2009/06/analytical-electrochemistry-the-basic-concepts/>
- [Khadir, 2013]:** A. Khadir; A. Tiss, *J Carcinogene Mutagene S14* (2013). DOI:10.4172/2157-2518.S14-002.
- [Khan 2011]:** N. Khan; J. Cheng; J. P. Pezacki; M. V. Berezovski, *Anal Chem*. 83 (2011) 6196–6201.
- [Khan, 2017]:** R. S. Khan; Z. Khurshid; F. Y. I. Asiri, *Diagnostics* 7 (2017). DOI: 10.3390/diagnostics7030039.
- [Khleif, 2010]:** S. N. Khleif; J. H. Doroshov; W. N. Hait, *Clin Cancer Res*. 16 (2010) 3299–3318.
- [Kilic, 2013]:** T. Kilic; S. N. Topkaya; M. Ozsoz, *Biosens Bioelectron*. 48 (2013) 165–171.
- [Kim, 2008]:** D. C. Kim; D. J. Kang, *Sensors* 8 (2008) 6605–6641.
- [Kim, 2009]:** Y. C. Kim; H. J. Kim; J. H. Park; D. I. Park; Y. K. Cho; C. I. Sohn; W. K. Jeon; B. I. Kim; J. H. Shin, *J Gastroenterol Hepatol*. 24 (2009) 1869–1875.
- [Kim, 2010]:** S. W. Kim; Z. Li; P. S. Moore; A. P. Monaghan; Y. Chang; M. Nichols; B. John, *Nucleic Acids Res*. 38 (2010) e98.
- [Kim, 2011]:** M-S. Kim; G. Stybayeva; J. Y. Lee; A. Revzin; D. J. Segal, *Nucleic Acids Res*. 39 (2011) e29.
- [Koch, 2000]:** A. E. Koch, *Ann Rheum Dis*. 59 (2000) i65–i67.
- [Kodadek, 2001]:** T. Kodadek, *Chem Biol*. 8 (2001) 105–115.
- [Kołodziejczyk, 2013]:** J. Kołodziejczyk; M. B. Ponczek, *Contemp Oncol (Pozn)*. 17 (2013) 113–119.

- [Kong, 2006]: S. Y. Kong; B. H. Nam; K. S. Lee; Y. Kwon; E. S. Lee; M. W. Seong; D. H. Lee; J. Ro, *Clin Chem.* 52 (2006) 1510–1515.
- [Kong, 2010]: W. Kong; L. He; M. Coppola; J. Guo; N. N. Esposito; D. Coppola; J. Q. Cheng, *J Biol Chem.* 285 (2010) 17869–17879.
- [Kong, 2012]: Y. W. Kong; D. Ferland-McCollough; T. J. Jackson; M. Bushell, *Lancet Oncol.* 13 (2012) e249–258.
- [König, 2017]: F. König; T. Schubert; G. Längst, *PLoS One.* 12 (2017) e0178875.
- [Korschelt, 2018]: K. Korschelt; M. N. Tahir; W. Tremel, *Chem Eur J.* 24 (2018) 9703–9713.
- [Koscianska, 2011]: E. Koscianska; J. Starega-Roslan; L. J. Sznajde; M. Olejniczak; P. Galka-Marciniak; W. J. Krzyzosiak, *BMC Mol Biol.* 12 (2011) 14.
- [Koshkin, 1998]: A. A. Koshkin; S. K. Singh; P. Nielsen; V. K. Rajwanshi; R. Kumar; M. Meldgaard; C. E. Olsen; J. Wengel, *Tetrahedron* 54 (1998) 3607–3630.
- [Kricka, 1999]: L. J. Kricka, *Clin Chem.* 45 (1999) 942–956.
- [Kudr, 2018]: J. Kudr; B. Klejdus; V. Adam; O. Zitka, *Trends Analyt Chem.* 98 (2018) 104–113.
- [Kulasingam, 2008]: V. Kulasingam; E. P. Diamandis, *Nat Clin Pract Oncol.* 5 (2008) 588–599.
- [Kumar, 2016]: S. Kumar; J. G. Sharma; S. Maji; B. D. Malhotra, *RSC Adv.* 6 (2016) 77037–77046.
- [Kuppusamy, 2017]: P. Kuppusamy; N. Govindan; M. M. Yusoff; S. J. A. Ichwan, *Saudi J Biol Sci.* 14 (2017) 1212–1221.
- [Kuramitz, 2009]: H. Kuramitz, *Anal Bioanal Chem.* 394 (2009) 61–69.
- [Kurkuba, 2015]: K. R. Kurkuba; S. B. Montgomery, *Cold Spring Harb Protoc.* 2015 (2015) 951–969.

L

- [Labib, 2013]: M. Labib; N. Khan; S. M. Ghobadloo; J. Cheng; J. P. Pezacki; M. V. Berezovski, *J Am Chem Soc.* 135 (2013) 3027–3038.
- [Labib, 2016]: M. Labib; E. H. Sargent; S. O. Kelley, *Chem Rev.* 116 (2016) 9001–9090.
- [Labuda, 2010]: J. Labuda; A. M. O. Brett; G. Evtugyn; M. Fojta; M. Mascini; M. Ozsoz; I. Palchetti; E. Paleček; J. Wang, *Pure Appl Chem.* 82 (2010) 1161–1187.
- [Laocharoensuk, 2016]: R. Laocharoensuk, *Electroanalysis* 28 (2016) 1716–1729.
- [Le, 2009]: M. T. Le; C. Teh; N. Shyh-Chang; H. Xie; B. Zhou; V. Korzh; H. F. Lodish; B. Lim, *Genes Dev.* 23 (2009) 862–876.

- [Lech, 2016]:** G. Lech; R. Słotwiński; M. Słodkowski; W. Krasnodębski, *World J Gastroenterol.* 22 (2016) 1745–1755.
- [Lee, 2003]:** Y. Lee; C. Ahn; J. Han; H. Choi; J. Kim; J. Yim; J. Lee; P. Provost; O. Rådmark; S. Kim; V. N. Kim, *Nature* 425 (2003) 415–419.
- [Lee, 2007]:** J. M. Lee; H. K. Park; Y. Jung; J. K. Kim; S. O. Jung; B. H. Chung, *Anal Chem.* 79 (2007) 2680–2687.
- [Lee, 2016]:** M. H. Lee; S-Y. Jung; S. H. Kang; E. J. Song; I. H. Park; S-Y. Kong; Y. M. Kwon; K. S. Lee; H-S. Kang; E. S. Lee, *PLoS One.* 11 (2016) e0163370.
- [Lehman, 2010]:** N. Lehman, *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 1 (2010) 202–213.
- [Leng, 2008]:** S. X. Leng; J. E. McElhaney; J. D. Walston; D. Xie; N. S. Fedarko; G. A. Kuchel, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63 (2008) 879–884.
- [Li, 2000]:** C. Li; B. Guo; P. B. Wilson; A. Steward; G. Byrne; N. Bundred; S. Kumar, *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89 (2000) 122–126.
- [Li, 2002]:** G. Li; R. Stewart; B. Conlan; A. Gilbert; P. Roeth; H. Nair, *Vox Sang.* 83 (2002) 332–338.
- [Li, 2008]:** F. Li; W. Chen; S. Zhang, *Biosens Bioelectron.* 24 (2008) 781–786.
- [Li, 2009]:** W. Li; K. Ruan, *Anal Bioanal Chem.* 394 (2009) 1117–1124.
- [Li, 2010]:** D. Li; S. Song; C. Fan, *Acc Chem Res.* 43 (2010) 631–641.
- [Li, 2014^a]:** C-S. Li; S-X. Zhang; H-J. Liu; Y-L. Shi; L-P. Li; X-B. Guo; Z-H. Zhang, *Biomarkers* 19 (2014) 81–85.
- [Li, 2014^b]:** X. Li; S. Roslan; C. N. Johnstone; C. N. Wright; C. P. Bracken; M. Anderson; A. G. Bert; L. A. Selth; R. L. Anderson; G. J. Goodall; P. A. Gregory; Y. Khew-Goodall, *Oncogene.* 33 (2014) 4077–4088.
- [Li, 2014^c]:** F. Li; J. Peng; J. Wang; H. Tang; L. Tan; Q. Xie, S. Yao, *Biosens Bioelectron.* 54 (2014) 158–164.
- [Li, 2015^a]:** P. Li; W-J. Xue; Y. Feng; Q-S. Mao, *Am J Transl Res.* 7 (2015) 2053–2059.
- [Li, 2015^b]:** Y. Li; Z. Shen; X-Y. Yu, *Nat Rev Cardiol.* 12 (2015) 198.
- [Li, 2015^c]:** C. Li; Z. Liu; S. Cai; F. Wen; D. Wu; Y. Liu; F. Wu; J. Lan; Z. Han; J. Chen, *Electrochem Commun.* 60 (2015) 185–189.
- [Li, 2015^d]:** M.-h. Li; S.-b. Fu; H.-s. Xiao, *Acta Pharmacol Sin.* 36 (2015) 1200–1211.
- [Li, 2016^a]:** J. Li; Y. Ye; M. Wang; L. Lu; C. Han; Y. Zhou; J. Zhang; Z. Yu; X. Zhang; C. Zhao; M J. Wen; Q. Kan, *Tumor Biol.* 37 (2016) 6881–6891.
- [Li, 2016^b]:** L. Li; J. Feng; H. Liu; Q. Li; L. Tong; B. Tang, *Chem Sci.* 7 (2016) 1940–1945.
- [Li, 2017]:** C. Li; Y. Yin; X. Liu; X. Xi; W. Xue; Y. Qu, *Oncotarget* 8 (2017) 24564–24578.

- [Liang, 2018]: M. Liang; M. Pan; J. Hu; F. Wang; X. Liu, *ChemElectroChem*. 5 (2018) 1380–1386.
- [Liébana, 2016]: S. Liébana, G. A. Drago, *Essays Biochem*. 60 (2016) 59–68.
- [Lieth, 2009]: C-W von der Lieth; T. Lütteke; M. Frank. (2009) *Bioinformatics for glycobiology and glycomics: An introduction*. Hoboken. NJ. Wiley-Blackwell.
- [Lin, 2016]: M. Lin; P. Song; G. Zhou; X. Zuo; A. Aldalbahi; X. Lou; J. Shi; C. Fan, *Nat Protoc*. 11 (2016) 1244–1263.
- [Liu, 2007]: W. Liu; S. Y. Mao; W. Y. Zhu, *World J Gastroenterol*. 13 (2007) 497–502.
- [Liu, 2008]: C. G. Liu; G. A. Calin; S. Volinia; C. M. Croce, *Nat Protoc*. 3 (2008) 563–578.
- [Liu, 2012]: Y. Liu; J. Zhao; P. Y. Zhang; Y. Zhang; S. Y. Sun; S. Y. Yu; Q. S. Xi, *Med Sci Monit*. 18 (2012) 299–308.
- [Liu, 2014^a]: J. Liu; C-Y. Lu; H. Zhou; J-J. Xu; H-Y. Chen, *ACS Appl Mater Interfaces*. 6 (2014) 20137–20143.
- [Liu, 2014^b]: S. Liu; Y. Lin; T. Liu; C. Cheng; W. Wei; L. Wang; F. Li, *Biosens Bioelectron*. 56 (2014) 12–18.
- [Liu, 2015]: J. Liu; W. Huang; H. Yan; Y. Luo, *Biotechnol Biotec Eq*. 29 (2015) 840–843.
- [Liu, 2017]: Y. Liu; Y. Liao; L. Xiang; K. Jiang; S. Li; M. Huangfu; S. Sun, *Int J Clin Oncol*. 22 (2017) 291–296.
- [Lodish, 2000]: H. Lodish; A. Berk; S. L. Zipursky. (2000). The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. En *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman.
- [López-Orozco, 2015]: J. López-Orozco; J. M. Pare; A. L. Holme; S. G. Chaulk; R. P. Fahlman; T. C. Hobman, *RNA* 21 (2015) 2030–2038.
- [Low, 2015]: K. F. Low; P. Rijiravanich; K. K. Singh; W. Surareungchai; C. Y. Yean, *J Biomed Nanotechnol*. 11 (2015) 702–710.
- [Lowe, 2004]: G. D. O Lowe; A. Rumley; I. J. Mackie, *Ann Clin Biochem*. 41 (2004) 430–440.
- [Lu, 2007]: Z. Lu; C. M. Li; Q. Zhou; Q. L. Bao; X. Cui, *J Colloid Interface Sci*. 314 (2007) 80–88.
- [Ludwig, 2005]: J. A. Ludwig; J. N. Weinstein, *Nat Rev Cancer*. 5 (2005) 845–856.

M

- [Ma, 2015]: Z. F. Ma; N. Liu; *Expert Rev Mol Diagn*. 15 (2015) 1–9.
- [Ma, 2016]: W. Ma; B. Situ; B. Li; X. Yin; P. Vadgama; L. Zheng; W. Wang, *Biosens Bioelectron*. 80 (2016) 344–351.

- [Macdonald, 2017]:** I. K. Macdonald; C. B. Parsy-Kowalska; C. J. Chapman, *Trends Cancer*. 3 (2017) 196–213.
- [Mackie, 2003]:** I. J. Mackie, S. Kitchen; S. J. Machin; G. D. Lowe, *Br J Haematol*. 121 (2003) 396–404.
- [Makaraviciute, 2013]:** A. Makaraviciute; A. Ramanaviciene, *Biosens Bioelectron*. 50 (2013) 460–471.
- [Malhotra, 2012]:** R. Malhotra; V. Patel; B. V. Chikkaveeraiah; B. S. Munge; S. C. Cheong; R. B. Zain; M. T. Abraham; D. K. Dey; J. S. Gutkind; J. F. Rusling, *Anal Chem*. 84 (2012) 6249–6255.
- [Maltez-da Costa, 2012]:** M. Maltez-da Costa; A. de la Escosura-Muñiz; C. Nogués; L. Barrios; E. Ibáñez; A. Merkoçi, *Nano Lett*. 12 (2012) 4164–4171.
- [Mandli, 2017]:** J. Mandli; H. Mohammadi; A. Amine, *Bioelectrochemistry* 116 (2017) 17–23.
- [Manne, 2017]:** U. Manne; B-D. K. Putcha, T. Samuel; S. Srivastava. (2017). Prognostic and Predictive Biomarkers for Colorectal Cancer. En S. Srivastava (Ed.). *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection*. West Sussex, UK, John Wiley & Sons, Ltd.
- [Mao, 2014]:** Y. Mao; H-h. Yen; Y. Sun; Z. Lv; R. Huang, *J Immunol*. 192 (2014). http://www.jimmunol.org/content/192/1_Supplement/69.17.
- [Markou, 2014]:** A. Markou; G. M. Yousef; E. Stathopoulos; V. Georgoulas; E. Lianidou, *Clin Chem*. 60 (2014) 197–205.
- [Marques, 2014]:** R. C. B. Marques; S. Viswanathan; H. P. A. Nouws; C. Delerue-Matos; M. B. González-García, *Talanta* 129 (2014) 594–599.
- [Martínez-García, 2015]:** G. Martínez-García; V. Serafín; L. Aguí; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* 27 (2015) 1119–1126.
- [Martínez-García, 2017]:** G. Martínez-García; E. Pérez-Julián; L. Agüí; N. Cabré; J. Joven; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Biosensors* 7 (2017) 50.
- [Martínez-Periñán, 2018]:** E. Martínez-Periñán; E. Sánchez-Tirado; A. González-Cortés; R. Barderas; J. M. Sánchez-Puelles; L. Martínez-Santamaría; S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón. *Electrochim Acta*. 292 (2018) 887–894.
- [Mascarell, 2014]:** P. G. Mascarell; C. Peel, I (2014) *Biomarcadores en la práctica clínica. Validación y verificación*. Dianas 3(1): e20140914. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140914 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>.
- [Massagué, 2007]:** J. Massagué, *N Engl J Med*. 356 (2007) 294–297.
- [Matin, 2018]:** F. Matin; V. Jeet; L. Moya; L. A. Selth; S. Chambers, J. A. Clements; J. Batra, *Sci Rep*. 8 (2018) 6653.
- [Mattie, 2006]:** M. D. Mattie; C. C. Benz; J. Bowers; K. Sensinger; L. Wong; G. K. Scott; V. Fedele; D. Ginzinger; R. Getts; C. Hagg, *Mol Cancer*. 5 (2006). DOI: 10.1186/1476-4598-5-24.

- [Mattocks, 2010]:** C. J. Mattocks; M. A. Morris; G. Matthijs; E. Swinnen; A. Corveleyn; E. Dequeker; C. R Müller; V. Pratt; A. Wallace, *Eur J Hum Genet.* 18 (2010) 1276–1288.
- [Mayr, 2007]:** C. Mayr; M. T. Hemann; D. P. Bartel, *Science* 315 (2007) 1576–1579.
- [McGrath, 2013]:** M. J. McGrath; C. N. Scanail. (2013). Sensing and Sensor Fundamentals. En: *Sensor Technologies*. Berkeley, CA. Apress.
- [Mei, 2016]:** Y. Mei; S. Zhao; X. Lu; H. Liu; X. Li; R. Ma, *PLoS One.* 11 (2016) e0146233.
- [Meirinho, 2016]:** S. G. Meirinho; L. G. Dias; A. M. Peres; L. R. Rodrigues, *Biotechnol Adv.* 34 (2016) 941–953.
- [Melanson, 2007]:** S. E. F. Melanson; M. J. Tanasijevic; P. Jarolim, *Circulation* 116 (2007) e501–504.
- [Mello, 2002]:** L. D. Mello; L. T. Kubota, *Food Chem.* 77 (2002) 237–256.
- [Meng, 2017]:** Q. Meng; L. Xiang; J. Fu; X. Chu; C. Wang; B. Yan, *Oncotarget* 8 (2017) 37321–37331.
- [Miao, 2015^a]:** P. Miao; Y. Tang; B. Wang; J. Yin; L. Ning, *Trends Analyt Chem.* 67 (2015) 1–15.
- [Miao, 2015^b]:** P. Miao; B. Wang; F. Meng; J. Yin; Y. Tang, *Bioconjugate Chem.* 26 (2015) 602–607.
- [Miao, 2015^c]:** P. Miao; Y. Tang; J. Yin, *Chem Commun.* 51 (2015) 15629–15632.
- [Miao, 2016]:** X. Miao; W. Wang; T. Kang; J. Liu; K-K. Shiu; C-H. Leung; D-L. Ma, *Biosens Bioelectron.* 86 (2016) 454–458.
- [Michailidou, 2016]:** E. Michailidou; G. Tzimagiorgis; F. Chatzopoulou; K. Vahtsevanos; K. Antoniadis; S. Koudou; A. Markopoulos; D. Antoniadis, *Cancer Epidemiol.* 43 (2016) 113–118.
- [Miesbach, 2010]:** W. Miesbach; J. Schenk; S. Alesci; E. Lindhoff-Last, *Thromb Res.* 126 (2010) 428–433.
- [Minko, 2004]:** T. Minko, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 491–509.
- [Minunni, 2003]:** M. Minunni, *Spectroscopy* 17 (2003) 613–625.
- [Mohamad, 2015]:** N. R. Mohamad; N. H. C. Marzuki; N. A. Buang; F. Huyop; R. A. Wahab, *Biotechnol Biotechnol Equip.* 29 (2015) 205–220.
- [Mohamed, 2015]:** R. A. Mohamed; H. M. Maghraby; E. M. Abd El Salam; H. M. Nageb; E. E. Ahmad; N. A. Mohamed, *Egypt J Intern Med.* 27 (2015) 15–20.
- [Mohammed, 2015]:** H. Mohammed; I. A. Russell; R. Stark; O. M. Rueda; T. E. Hickey; G. A. Tarulli; A. A. Serandour; S. N. Birrell; A. Bruna; A. Saadi; S. Menon; J. Hadfield; M. Pugh; G. V. Raj; G. D. Brown; C. D'Santos; J. L. Robinson; G. Silva; R. Launchbury; C. M. Perou; J. Stingl; C. Caldas; W. D. Tilley; J. S. Carroll, *Nature* 523 (2015) 313–317.

- [Mohanty, 2001]:** S. Mohanty. (2001). *Biosensors: A Survey Report*.
- [Monošík, 2012]:** R. Monošík; M. Stredánský; E. Šturdík, *Acta Chim Slov.* 5 (2012) 109–120.
- [Montiel, 2015^a]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; F. Conzuelo; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Gamella; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Talanta* 131 (2015) 156–162.
- [Montiel, 2015^b]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; A. Pellicanò; R. M. Torrente-Rodríguez; A. J. Reviejo; M. S. Cosio; J. M. Pingarrón, *Anal Chim Acta.* 880 (2015) 52–59.
- [Montiel, 2016^a]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; R. M. Torrente-Rodríguez; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Food Chem.* 213 (2016) 595–601.
- [Montiel, 2016^b]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; A. Pellicanò; A. J. Reviejo; M. S. Cosio; J. M. Pingarrón, *Chemosensors* 4 (2016) 11.
- [Montiel, 2016^c]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; A. Pellicanò; S. Campuzano; R. M. Torrente-Rodríguez; A. J. Reviejo; M. S. Cosio; J. M. Pingarrón, *Sens Actuators B Chem.* 236 (2016) 825–833.
- [Montiel, 2017^a]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; M. L. Gutiérrez; R. M. Torrente-Rodríguez; E. Povedano; E. Vargas; A. J. Reviejo; R. Linacero; F. J. Gallego; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Anal Chem.* 89 (2017) 9474–9482.
- [Montiel, 2017^b]:** V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. M. Torrente-Rodríguez; G. González de Rivera; A. J. Reviejo; C. Cuadrado; R. Linacero; F. J. Gallego; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Sens Actuators Chem. B.* 245 (2017) 895–902.
- [Mordente, 2015]:** A. Mordente; E. Meucci; G. Martorana; A. Silvestrini, *Adv Exp Med Biol.* 867 (2015) 9–26.
- [Moreno-Guzmán, 2010]:** M. Moreno-Guzmán; M. Eguílaz; A. González-Cortés; P. Yañez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Analyst* 135 (2010) 1926–1933.
- [Müller, 2006]:** M. Müller; M. Meyer; T. Schilling; E. Ulsperger; T. Lehnert; H. Zentgraf; W. Stremmel; M. Volkmann; P. R. Galle, *Int J Oncol.* 29 (2006) 973–980.
- [Munge, 2011]:** B. S. Munge; A. L. Coffey; J. M. Doucette; B. K. Somba; R. Malhotra; V. Patel; J. S. Gutkind; J. F. Rusling, *Angew Chem Int Ed Engl.* 50 (2011) 7915–7918.
- [Munson, 2015]:** P. Munson; A. Shukla, *Medicines.* 2 (2015) 310–327.

N

- [Nam, 2008]:** E. J. Nam; H. Yoon; S. W. Kim; H. Kim; Y. T. Kim; J. H. Kim; J. W. Kim; S. Kim, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 2690–2695.
- [Nasheri, 2011]:** N. Nasheri; J. Cheng; R. Singaravelu; P. Wu; M. T. McDermott; J. P. Pezacki, *Anal Biochem.* 412 (2011) 165–172.

[Nassiri, 2011]: F. Nassiri; M. D. Cusimano; B. W. Scheithauer; F. Rotondo; A. Fazio; G. M. Yousef; L. V. Syro; K. Kovacs; R. V. Lloyd, *Anticancer Res.* 31 (2011) 2283–2290.

[Nedaeinia, 2017]: R. Nedaeinia; M. Manian; M. H. Jazayeri; M. Ranjbar; R. Salehi; M. Sharifi; F. Mohaghegh; M. Goli; S. H. Jahednia; A. Avan; M. Ghayour-Mobarhan, *Cancer Gene Ther.* 24 (2017) 48–56.

[Negm, 2016]: O. H. Negm; M. R. Hamed; R. E. Schoen; R. L. Whelan; R. J. Steele; J. Scholefield; E. M. Dilnot; H. M. C. Shantha Kumara; J. F. R. Robertson; H. F. Sewell, *PLoS One.* 11 (2016) e0156971.

[Nelson, 2008]: P. T. Nelson; W-X. Wang; B. W. Rajeev, *Brain Pathol.* 18 (2008) 130–138.

[Nesterova, 2006]: M. Nesterova; N. Johnson; C. Cheadle; Y. S. Cho-Chung, *Biochim Biophys Acta.* 1762 (2006) 398–403.

[Nielsen, 1991]: P. E. Nielsen; M. Egholm; R. H. Berg; O. Buchardt, *Science* 254 (1991) 1497–1500.

[Niño, 2007]: L. A. G. Niño; A. A. Garavito; C. E. Jaramillo; S. J. Velásquez; R. D. S. Corcho; B. H. A. Bernal, *Rev Colomb Cancerol.* 11 (2007) 40–57.

[Noh, 2015]: S. Noh; D. T. Ha; H. Yang; M-S. Kim, *Analyst* 140 (2015) 3947–3952.

[Nolan, 2006]: T. Nolan; R. E. Hands; S. A. Bustin, *Nat Protoc.* 1 (2006) 1559–1582.

[Nuovo, 2010]: G. J. Nuovo, *Methods* 52 (2010) 307–315.

O

[Obika, 1998]: S. Obika; D. Nanbu; Y. Hari; J-i. Andoh; K-i. Morio; T. Doi; T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 5401–5404.

[Oggè, 2010]: G. Oggè; R. Romero; J. P. Kusanovic; T. Chaiworapongsa; Z. Dong; P. Mittal; E. Vaisbuch; S. Mazaki-Tovi; J. M. Gonzalez; L. Yeo; S. S. Hassan, *J Matern Fetal Neonatal Med.* 23 (2010) 820–827.

[Oishi, 2015]: M. Oishi, *Anal Bioanal Chem.* 407 (2015) 4165–4172.

[Ojeda, 2014^a]: I. Ojeda; M. Moreno-Guzmán; A. González-Cortés; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Anal Bioanal Chem.* 406 (2014) 6363–6371.

[Ojeda, 2014^b]: I. Ojeda; B. Garcinuño; M. Moreno-Guzmán; A. González-Cortés; M. Yudasaka; S. Iijima; F. Langa; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Anal Chem.* 86 (2014) 7749–7756.

[Ortiz, 2011]: M. Ortiz; A. Fragoso; C. K. O’Sullivan, *Anal Chem.* 83 (2011) 2931–2938.

[Ozen, 2008]: M. Ozen; C. J. Creighton; M. Ozdemir; M. Ittmann, *Oncogene* 27 (2008) 1788–1793.

[Ozka, 2017]: D. Ozkan-Ariksoysal, *J Electrochem Soc.* 164 (2017) B258–B266.

P

[Pakchin, 2017]: P. S. Pakchin; S. A. Nakhjavani; R. Saber; H. Ghanbari; Y. Omid, *Trends Analyt Chem.* 92 (2017) 32–41.

[Palchetti, 2014]: I. Palchetti, *Bioanalysis.* 6 (2014) 3417–3435.

[Paleček, 2012]: E. Paleček; M. Bartošík, *Chem Rev.* 112 (2012) 3427–3481.

[Pall, 2007]: G. S. Pall; C. Codony-Servat; J. Byrne; L. Ritchie; A. Hamilton, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) e60.

[Pallasch, 2005]: C. P. Pallasch; A-K. Struss; A. Munnia; J. König; W-I. Steudel; U. Fischer; E. Meese, *Int J Cancer.* 117 (2005) 456–459.

[Paniel, 2010]: N. Paniel; A. Radoi; J-L. Marty, *Sensors* 10 (2010) 9439–9448.

[Paoletti, 2014]: C. Paoletti; D. F. Hayes, *Annu Rev Med.* 65 (2014) 95–110.

[Parasramka, 2012]: M. A. Parasramka; E. Ho; D. E. Williams; R. H. Dashwood, *Mol Carcinog.* 51 (2012) 213–230.

[Patel, 2016]: S. Patel; R. Nanda; S. Sahoo; E. Mohapatra, *Biochem Res Int.* 2016 (2016).

[Patrie, 2007]: S. M. Patrie; M. Mrksich, *Anal Chem.* 79 (2007) 5878–5887.

[Patris, 2014]: S. Patris; P. D. Pauw; M. Vandeput; J. Huet; P. V. Antwerpen; S. Muyldermans; J-M. Kauffmann, *Talanta* 130 (2014) 164–170.

[Pedersen, 2013]: J. W. Pedersen; A. Gentry-Maharaj; E-O. Fourkala; A. Dawnay; M. Burnell; A. Zaikin; A. E. Pedersen; I. Jacobs; U. Menon; H. H. Wandall, *Br J Cancer.* 108 (2013) 107–114.

[Pei, 2012]: H. Pei; J. Li; M. Lv; J. Wang; J. Gao; J. Lu; Y. Li; Q. Huang; J. Hu; C. Fan, *J Am Chem Soc.* 134 (2012) 13843–13849.

[Peláez-García, 2013]: A. Peláez-García; R. Barderas; S. Torres; P. Hernández-Varas; J. Teixidó; F. Bonilla; A. G. de Herreros; J. I. Casal, *PLoS One.* 8 (2013) e63695.

[Peláez-García, 2015]: A. Peláez-García (2015). *Análisis genético y funcional de biomarcadores en cáncer colorrectal y estudio proteómico del papel de snail en fibroblastos tumorales.* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

[Peng, 2017]: Q. Peng; X. Zhang; M. Min; L. Zou; P. Shen; Y. Zhu, *Oncotarget* 8 (2017) 44893–44909.

[Perumal, 2014]: V. Perumal; U. Hashim, *J Appl Biomed.* 12 (2014) 1–15.

[Piasecka, 2018]: D. Piasecka; M. Braun; R. Kordek; R. Sadej; H. Romanska, *J Cancer Res Clin Oncol.* 144 (2018) 1401–1411.

[Pinatel, 2014]: E. M. Pinatel; F. Orso; E. Penna; D. Cimino; A. R. Elia; P. Circosta; P. Dentelli; M. F. Brizzi; P. Provero; D. Taverna, *PLoS One.* 9 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0084859.

- [Pividori, 2000]:** M. I. Pividori; A. Merkoçi; S. Alegret, *Biosens Bioelectron.* 15 (2000) 291–303.
- [Planell-Saguer, 2013]:** M. de Planell-Saguer; M. C. Rodicio, *Clin Biochem.* 46 (2013) 869–878.
- [Plavetic, 2012]:** N. D. Plavetic; A. Kulic; D. Vrbanc, *Periodicum Biologorum.* 114 (2012) 505–510.
- [Pöhlmann, 2015]:** C. Pöhlmann; M. Sprinzl (2015). *RNA and DNA Diagnostics* (Eds: V. A. Erdmann (Ed.); S. Jurga (Ed.); J. Barciszewski (Ed.). Cham. Switzerland Springer International Publishing. pp. 21–45.
- [Pons, 2015]:** M. G. Pons; M. Cruz-Correa, *BioMed Research International.* 2015 (2015) ID 149014.
- [Povedano, 2018^a]:** E. Povedano; E. Vargas; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Pedrero; R. Barderas; P. San Segundo-Acosta; A. Peláez-García; M. Mendiola; D. Hardisson; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Sci Rep.* 8 (2018) 6419.
- [Povedano, 2018^b]:** E. Povedano; A. Valverde; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; M. Pedrero; P. Yañez-Sedeño; R. Barderas; P. San Segundo-Acosta; A. Peláez-García; M. Mendiola; D. Hardisson; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Angew Chem Int Ed.* 57 (2018) 8194–8198.
- [Powers, 2012]:** A. D. Powers; S. P. Palecek, *J Healthc Eng.* 3 (2012) 503–534.
- [Prats-Alfonso, 2012]:** E. Prats-Alfonso; X. Sisquella; N. Zine; G. Gabriel; A. Guimerà; F. J. del Campo; R. Villa; A. H. Eisenberg; M. Mrksich; A. Errachid; J. Aguiló; F. Albericio, *Small* 8 (2012) 2106–2115.
- [Presnova, 2017]:** G. Presnova; D. Presnov; V. Krupenin; V. Grigorenko; A. Trifonov; I. Andreeva; O. Ignatenko; A. Egorov; M. Rubtsova, *Biosens Bioelectron.* 88 (2017) 283–289.
- [Press, 1993]:** M. F. Press; M. C. Pike; V. R. Chazin; G. Hung; J. A. Udove; M. Markowicz; J. Danyluk; W. Godolphin; M. Sliwowski; R. Akita; M. C. Paterson; D. J. Slamon, *Cancer Res.* 53 (1993) 4960–4970.
- [Prieto-Simón, 2008]:** B. Prieto-Simón; M. Campàs, J-L. Marty, *Protein Pept Lett.* 15 (2008) 757–763.
- [Pritchard, 2012]:** C. C. Pritchard; H. H. Cheng; M. Tewari, *Nat Rev Genet.* 13 (2012) 358–369.

Q

- [Qavi, 2010]:** A. J. Qavi; J. T. Kindt; R. C. Bailey, *Anal Bioanal Chem.* 398 (2010) 2535–2549.
- [Qiu, 2013]:** L. Qiu; L. Qiu; Z-S. Wu; G. Shen; R-Q. Yu, *Anal Chem.* 85 (2013) 8225–8231.
- [Quintanilla, 2015]:** M. Quintanilla; G. del Castillo; E. Sánchez-Blanco; E. Martín-Villar; A. C. V. Díez; C. Langa; E. Pérez-González; J. Renart; C. Bernabéu, *Cancer Cell & Microenvironment* 2 (2015) e706. DOI: 10.14800/ccm.706.

[Qureshi, 2015]: A. Qureshi; Y. Gurbuz; J. H. Niazi, *Sens Actuators B Chem.* 220 (2015) 1145–1151.

R

[Rahi, 2015]: A. Rahi; H. Heli, *JAMSAT.* 1 (2015).

[Rahman, 2015]: M. M. Rahman; X-B. Li; N. S. Lopa; S. J. Ahn; J-J. Lee, *Sensors* 15 (2015) 3801–3829.

[Rajewsky, 2006]: N. Rajewsky, *Nat Genet.* 38 (2006) S8–13.

[Rama, 2016]: E. C. Rama; A. Costa-García, *Electroanalysis* 28 (2016) 1700–1715.

[Ramassone, 2018]: A. Ramassone; S. Pagotto; A. Veronese; R. Visone, *Int J Mol Sci.* 19 (2018) 459.

[Ramkissoo, 2006]: S. H. Ramkissoo; L. A. Mainwaring; E. M. Sloand; N. S. Young; S. Kajigaya, *Mol Cell Probes.* 20 (2006) 1–4.

[Ramos, 2014]: S. B. V. Ramos; A. Laederach, *Nature* 505 (2014) 621–622.

[Ranjan, 2017]: R. Ranjan; E. N. Esimbekova; V. A. Kratasyuk, *Biosens Bioelectron.* 87 (2017) 918–930.

[Rapisuwon, 2016]: S. Rapisuwon; E. E. Vietsch; A. Wellstein, *Comput Struct Biotechnol J.* 14 (2016) 211–222.

[Rashid, 2017]: J. I. A. Rashid; N. A. Yusof, *Sens Biosensing Res.* 16 (2017) 19–31.

[Rasooly, 2006]: A. Rasooly; K. E. Herold, *J AOAC Int.* 89 (2006) 873–883.

[Rasti, 2016]: A. Rasti; M. Mehrazma; Z. Madjd; A. A. Keshtkar; R. Roudi; S. Babashah, *BMJ Open* 6 (2016) e009667.

[Rastogi, 2016]: M. Rastogi; S. Gupta; M. Sachan, *Braz Arch Biol Technol.* 59 (2016).

[Ravalli, 2015]: A. Ravalli; C. G. da Rocha; H. Yamanaka; G. Marrazza, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 268–275.

[Real-Fernández, 2008]: F. Real-Fernández; A. Colson; J. Bayardon; F. Nuti; E. Peroni; R. Meunier-Prest; F. Lolli; M. Chelli; C. Darcel; S. Jugé; A. M. Papini, *Biopolymers* 90 (2008) 488–495.

[Reddy, 2015]: K. B. Reddy, *Cancer Cell Int.* 15 (2015) DOI: 10.1186/s12935-015-0185-1.

[Reis-Filho, 2008]: J. S. Reis-Filho; S. R. Lakhani, *J Pathol.* 216 (2008) 394–398.

[Ren, 2015]: J. Ren; T. Wang; E. Wang; J. Wang, *Analyst* 140 (2015) 2556–2572.

[Ren, 2017]: J. Ren; T. H. Kuang; J. Chen; J. W. Yang; Y. X. Liu, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 21 (2017) 120–130.

- [Reverté, 2016]:** L. Reverté; B. Prieto-Simón; M. Campàs, *Anal Chim Acta*. 908 (2016) 8–21.
- [Reviejo, 2000]:** A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón, *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, ISSN 1575-3417, Nº.2, (2000) 5–15.
- [Rhee, 2009]:** W. J. Rhee; G. Bao, *BMC Biotechnol.* 9 (2009) 30.
- [Ripoli, 2016]:** F. L. Ripoli; A. Mohr; S. C. Hammer; S. Willenbrock; M. Hewicker-Trautwein; S. Hennecke; H. M. Escobar; I. Nolte, *Int J Mol Sci.* 17 (2016) 724.
- [Roda, 2011]:** A. Roda; M. Guardigli, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 69–76.
- [Roda, 2016]:** A. Roda; M. Mirasoli; E. Michelini; M. Di Fusco; M. Zangheri; L. Cevenini; B. Roda; P. Simoni, *Biosens Bioelectron.* 76 (2016) 164–179.
- [Rodenhiser, 2006]:** D. Rodenhiser; M. Mann, *CMAJ.* 174 (2006) 341–348.
- [Ronkainen, 2010]:** N. J. Ronkainen; H. B. Halsall; W. R. Heineman, *Chem Soc Rev.* 39 (2010) 1747–1763.
- [Rosen, 2014]:** L. S. Rosen; M. S. Gordon; F. Robert; D. E. Matei, *Curr Oncol Rep.* 16 (2014) 365.
- [Royahem, 1998]:** J. Royahem; K. Conrad; M. Frey; J. Melhom; K. H. Frank (1998). Autoantibodies predictive parameters of tumor development? En: K. Conrad (Ed.); R. L. Humbel (Ed.); M. Meurer (Ed.); Y. Shoenfeld (Ed.); E. M. Tan (Ed.). *Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies*. Berlin: Pabst Science Publications. 412–414.
- [Rusling, 2010]:** J. F. Rusling; C. V. Kumar; J. S. Gutkind; V. Patel, *Analyst* 135 (2010) 2496–2511.
- [Rusling, 2013]:** J. F. Rusling, *Anal Chem.* 85 (2013) 5304–5310.

S

- [Saeed, 2017]:** A. A. Saeed; J. L. A. Sánchez; C. K. O’Sullivan; M. N. Abbas, *Bioelectrochemistry* 118 (2017) 91–99.
- [Sahibzada, 2017]:** H. A. Sahibzada; Z. Khurshid; R. S. Khan; M. Naseem; K. M. Siddique; M. Mali; M. S. Zafar, *Diagnostics* 7 (2017) 21.
- [Salimian, 2017]:** R. Salimian; L. Kékedy-Nagy; E. Ferapontova, *ChemElectroChem.* 4 (2017) 872–879.
- [Salvi, 2016]:** S. Salvi; G. Gurioli; U. De Giorgi; V. Conteduca; G. Tedaldi; D. Calistri; V. Casadio, *Onco Targets Ther.* 9 (2016) 6549–6559.
- [Sánchez, 2010]:** T. L. Sánchez; O. J. G. Hernández, *Rev Haban Cienc Méd.* 9 (2010) 172–180.
- [Sánchez-Tirado, 2017]:** E. Sánchez-Tirado; C. Salvo; A. González-Cortés; P. Yáñez-Sedeño; F. Langa; J. M. Pingarrón, *Anal Chim Acta.* 959 (2017) 66–73.

- [Sandri, 2004]:** M. T. Sandri; H. Johansson; M. Colleoni; L. Zorzino; R. Passerini; L. Orlando; G. Viale, *Anticancer Res.* 24 (2004) 1261–1266.
- [Sanz, 2010]:** A. S. Sanz; J. A. S. Redondo. (2010) Bases Tecnológicas de los Microarrays de Proteínas. Aplicaciones Clínicas. En *Actualizaciones en el Laboratorio Clínico*. Asociación Española de Biopatología Médica (Ed.).
- [Sasaki, 2015]:** T. Sasaki; N. Fuse; T. Kuwata; S. Nomura; K. Kaneko; T. Doi; T. Yoshino; H. Asano; A. Ochiai; Y. Komatsu; N. Sakamoto; A. Ohtsu, *Jpn J Clin Oncol.* 45 (2015) 43–48.
- [Sassolas, 2008]:** A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier; L. J. Blum, *Chem Rev.* 108 (2008) 109–139.
- [Sassolas, 2012]:** A. Sassolas; L. Blum; B. D. Leca-Bouvier, *Biotechnol Adv.* 30 (2012) 489–511.
- [Savad, 2012]:** S. Savad; P. Mehdipour; M. Miryounesi; R. Shirkoohi; F. Fereidooni; F. Mansouri; M. H. Modarressi, *Asian Pac J Cancer Prev.* 13 (2012) 873–877.
- [Schlichtiger, 2012]:** A. Schlichtiger; P. B. Luppá; D. Neumeier; M. Thaler, *Bioanal Rev.* 4 (2012) 75–86.
- [Schnettler, 2010]:** E. Schnettler; H. Hemmes; R. Huismann; R. Goldbach; M. Prins; R. Kormelink, *J Virol.* 84 (2010) 11542–11554.
- [Schroeder, 2010]:** H. W. Schroeder; L. Cavacini, *J Allergy Clin Immunol.* 125 (2010) 41–52.
- [Selim, 2014]:** F. O. Selim; A. M. Ahmed, *Int J Adv Res.* 2 (2014) 229–240.
- [Serafín, 2017^a]:** V. Serafín; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Batlle; P. García de Frutos; S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Microchim Acta.* 184 (2017) 4251–4258.
- [Serafín, 2017^b]:** V. Serafín; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Batlle; P. García de Frutos; S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Sens Actuators B Chem.* 240 (2017) 1251–1256.
- [Serafín, 2018]:** V. Serafín; R. M. Torrente-Rodríguez; A. González-Cortés; P. García de Frutos; M. Sabaté; S. Campuzano; P. Yáñez-Sedeño; J. M. Pingarrón, *Talanta* 179 (2018) 131–138.
- [Serio, 2012]:** R. Serio; B. Billack. (2012). Potential Tumor Biomarkers for Ovarian Cancer. En S. Farghaly (Ed.). *Ovarian Cancer*. IntechOpen, DOI: 10.5772/28397.
- [Seven, 2013]:** B. Seven; M. Bourourou; K. Elouarzaki; J. F. Constant; C. Gondran; M. Holzinger; S. Cosnier; S. Timur, *Electrochem Commun.* 37 (2013) 36–39.
- [Sharma, 2016]:** S. Sharma; H. Byrne; R. J. O’Kennedy, *Essays Biochem.* 60 (2016) 9–18.
- [Shedge, 2009]:** H. Y. Shedge (2009). *Specific and non-specific binding of proteins and nucleic acids on chemically modified reticulated vitreous carbon electrodes*. (Tesis Doctoral). Clemson University. Carolina del Sur. EEUU.
- [Sheng, 2013]:** L. Sheng; M. Luo; X. Sun; N. Lin; W. Mao; D. Su, *Int J Cancer.* 133 (2013) 2720–2725.
- [Shenouda, 2009]:** S. K. Shenouda; S. K. Alahari, *Cancer Metastasis Rev.* 28 (2009) 369–378.

- [Shi, 2009]:** Y. Shi; W. Huang; Y. Tan; X. Jin; R. Dua; E. Penuel; A. Mukherjee; J. Sperinde; H. Pannu; A. Chenna; L. DeFazio-Eli; S. Pidaparthi; Y. Badal; G. Wallweber; L. Chen; S. Williams; H. Tahir; J. Larson; L. Goodman; J. Whitcomb; C. Petropoulos; J. Winslow, *Diagn Mol Pathol*. 18 (2009) 11–21.
- [Shi, 2017^a]:** H-Z. Shi; Y-N. Wang; X-H. Huang; K-C. Zhang; H-Q. Xi; J-X. Cui, G-X. Liu; W-T. Liang; B. Wei; L. Chen, *World J Gastroenterol*. 23 (2017) 1836–1842.
- [Shi, 2017^b]:** Y. Shi; P. Ye; X. Long, *Cell Physiol Biochem*. 44 (2017) 804–816.
- [Shokouhimehr, 2010]:** M. Shokouhimehr; E. S. Soehnlen; J. Hao; M. Griswold; C. Flask; X. Fan; J. P. Basilion; S. Basu; S. D. Huang, *J Mater Chem*. 20 (2010) 5251–5259.
- [Si, 2007]:** M-L. Si; S. Zhu; H. Wu; Z. Lu; F. Wu; Y-Y. Mo, *Oncogene* 26 (2007) 2799–2803.
- [Si, 2013]:** H. Si; X. Sun; Y. Chen; Y. Cao; S. Chen; H. Wang; C. Hu, *J Cancer Res Clin Oncol*. 139 (2013) 139–229.
- [Sidransky, 2002]:** D. Sidransky, *Nat Rev Cancer*. 2 (2002) 210–219.
- [Simon, 2010]:** R. Simon, *Clin Trials*. 7 (2010) 516–524.
- [Singh, 2013]:** R. Singh; Y-Y. Mo, *Cancer Biol Ther*. 14 (2013) 201–212.
- [Siravegna, 2017]:** G. Siravegna; S. Marsoni; S. Siena; A. Bardelli, *Nat Rev Clin Oncol*. 14 (2017) 531–548.
- [Slamon, 1987]:** D. J. Slamon; G. M. Clark, S. G. Wong; W. J. Levin; A. Ullrich; W. L. McGuire, *Science* 235 (1987) 177–182.
- [Smerkova, 2015]:** K. Smerkova; K. Hudcova; V. Vlahova; M. Vaculovicova; V. Pekarik; M. Masarik; V. Adam; R. Kizek, *Int J Oncol*. 46 (2015) 871–877.
- [Smith, 1967]:** M. J. Smith; W. S. Beck, *Biochim Biophys Acta*. 147 (1967) 324–333.
- [Song, 2006]:** S. Song; H. Xu; C. Fan, *Int. J. Nanomedicine* 1 (2006) 433–440.
- [Song, 2012]:** K-M. Song; S. Lee; C. Ban, *Sensors* 12 (2012) 612–631.
- [Soussi, 2000]:** T. Soussi, *Cancer Res*. 60 (2000) 1777–1788.
- [Spear, 2001]:** B. B. Spear; M. Heath-Chiozzi; J. Huff, *Trends Mol Med*. 7 (2001) 201–204.
- [Spizzo, 2010]:** R. Spizzo; M. S. Nicoloso; L. Lupini; Y. Lu; J. Fogarty; S. Rossi; B. Zagatti; M. Fabbri; A. Veronese; X. Liu; R. Davuluri; C. M Croce; G. Mills; M. Negrini; G. A. Calin; *Cell Death Differ*. 17 (2010) 246–254.
- [Springer, 2010]:** T. Springer; H. Sípová; H. Vaisocherová; J. Stepánek; J. Homola, *Nucleic Acid Res*. 38 (2010) 7343–7351.
- [Springer, 2012]:** T. Špringer; J. Homola, *Anal Bioanal Chem*. 404 (2012) 2869–2875.
- [Stanczyk, 2008]:** J. Stanczyk; D. M. Pedrioli; F. Brentano; O. Sanchez-Pernaute O; C. Kolling; R. E. Gay; M. Detmar; S. Gay; D. Kyburz, *Arthritis Rheum*. 58 (2008) 1001–1009.

[Starega-Roslan, 2011]: J. Starega-Roslan; J. Krol; E. Koscianska; P. Kozlowski; W. J. Szlachcic, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 257–268.

[Suárez, 2015]: V. M. Suárez; L. O. del Valle Pérez; G. D. Domínguez; C. M. Abraham, *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter.* 31 (2015) 242–253.

[Sugita, 2011]: Y. Sugita. (2011). Angiogenesis of Primary Brain Tumors: The Role of Endoglin (CD105). En M. Garami (Ed.). *Molecular Targets of CNS Tumors*, IntechOpen, DOI: 10.5772/23926.

[Sun, 2010]: J. Sun; M. Masterman-Smith; N. A. Graham; J. Jiao; J. Mottahedeh; D. R. Laks; M. Ohashi; J. DeJesus; K. Kamei; K-B. Lee; H. Wang; Z. T. F. Yu; S. Hou; K. Li; M. Liu; N. Zhang; S. Wang; B. Angenieux; E. Panosyan; E. R. Samuels; J. Park; D. Williams; V. Konkankit; D. Nathanson; R. M. van Dam; M. E. Phelps; H. Wu; L. M. Liau; P. S. Mischel; J. A. Lazareff; H. I. Kornblum; W. H. Yong; T. G. Graeber; H-R. Tseng, *Cancer Res.* 70 (2010) 6128–6138.

[Sun, 2012]: X. Sun; Z. Ma, *Biosens Bioelectron.* 35 (2012) 470–474.

[Sun, 2014]: Z-Q. Sun; X-N. Han; H-J. Wang; Y. Tang; Z-L. Zhao; Y-L. Qu; R-W. Xu; Y-Y. Liu; X-B. Yu, *World J Gastroenterol.* 20 (2014) 8583–8591.

[Suppiah, 2013]: A. Suppiah; J. Greenman, *World J Gastroenterol.* 19 (2013) 4651–4670.

[Svatek, 2008]: R. S. Svatek; J. A. Karam; C. G. Roehrborn; P. Karakiewicz; K. M. Slawin; S. F. Shariat, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 3362–3366.

T

[Tadbir, 2014]: A. A. Tadbir; M. J. Ashraf; M. Moradi, *Middle East J Cancer.* 5 (2014) 7–12.

[Tainsky, 2009]: M. A. Tainsky, *Biochim Biophys Acta.* 1796 (2009) 176–193.

[Taleat, 2013]: Z. Taleat; C. Cristea; G. Marrazza; R. Săndulescu, *International Journal of Electrochemistry* 2013 (2013) Article ID 740265.

[Tan, 2009]: H. T. Tan; J. Low; S. G. Lim; M. C. M. Chung, *FEBS J.* 276 (2009) 6880–6904.

[Tang, 2010]: Z. Tang; H. Wu; D. Du; J. Wang; H. Wang; W. Qian; D. J. Bigelow; J. G. Pounds; R. D. Smith; Y. Lin, *Talanta* 81 (2010) 1662–1669.

[Tang, 2012]: W. Tang; J. Zhu; S. Su; W. Wu; Q. Liu; F. Su; F. Yu, *PLoS One.* 7 (2012) e51702.

[Tang, 2016]: C. K. Tang; A. Vaze; M. Shen; J. F. Rusling, *ACS Sens.* 1 (2016) 1036–1043.

[Tate, 2004]: J. Tate; G. Ward, *Clin Biochem Rev.* 25 (2004) 105–120.

[Taufik, 2011]: S. Taufik; N.A. Yusof; T.W. Tee; I. Ramli, *Int J Electrochem Sci.* 6 (2011) 1880–1891.

[Teja, 2009]: S. A. Teja; P-Y. Koh, *Prog Cryst Growth & Charact.* 55 (2009) 22–45.

[Teles, 2008]: F. R. R. Teles; L. P. Fonseca, *Talanta* 77 (2008) 606–623.

- [Tenhagen, 2012]: M. Tenhagen; P. J. van Diest; I. A. Ivanova; E. van der Wall; P. van der Groep, *Endocr Relat Cancer*. 19 (2012) R115–R129.
- [Thammaiah, 2016]: C. K. Thammaiah; S. Jayaram, *Non-coding RNA Research* 1 (2016) 77–82.
- [Thevenot, 2001]: D. Thevenot; K. Toth; R. Durst; G. Wilson, *Biosens Bioelectron*. 16 (2001) 121–131.
- [Thiele, 2017]: J-A. Thiele; K. Bethel; M. Králíčková; P. Kuhn, *Annu Rev Pathol*. 12 (2017) 419–447.
- [Tian, 2015]: T. Tian; J. Wang; X. Zhou, *Org Biomol Chem*. 13 (2015) 2226–2238.
- [Tiberio, 2015]: P. Tiberio; M. Callari; V. Angeloni; M. G. Daidone; V. Appierto, *Biomed Res Int*. 2015 (2015) 731479.
- [Tiong, 2016]: K. H. Tiong; B. S. Tan; H. L. Choo; F. F-L. Chung; L-W. Hii; S. H. Tan; N. T. W. Khor; S. F. Wong; S-J. See; Y-F. Tan; R. Rosli; S-K. Cheong; C-O. Leong, *Oncotarget* 7 (2016) 57633–57650.
- [Tomaino, 2011]: B. Tomaino; P. Cappello; M. Capello; C. Fredolini; I. Sperduti; P. Migliorini; P. Salacone; A. Novarino; A. Giacobino; L. Ciuffreda; M. Alessio; P. Nisticò; A. Scarpa; P. Pederzoli; W. Zhou; E. F. Petricoin; L. A. Liotta; M. Giovarelli; M. Milella; F. Novelli, *J Proteome Res*. (2011) 105–112.
- [Topisirovic, 2011]: I. Topisirovic; N. Sonenberg; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 76 (2011) 355–367.
- [Torrente-Rodríguez, 2017]: R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; M. Pedrero; M. Farchado; E. Vargas; F. J. Manuel de Villena; M. Garranzo-Asensio; R. Barderas; J. M. Pingarrón, *PLoS One*. 112 (2017) e0175056.
- [Tothill, 2009]: I. E. Tothill, *Semin Cell Dev Biol*. 20 (2009) 55–62.
- [Tran, 2013]: H. V. Tran; B. Piro; S. Reisberg; H. T. Duc; M. C. Pham, *Anal Chem*. 85 (2013) 8469–8474.
- [Tran, 2014]: H. V. Tran; B. Piro; S. Reisberg; L. H. Nguyen; T. D. Nguyen; H. T. Duc; M. C. Pham, *Biosens Bioelectron*. 62 (2014) 25–30.
- [Trilling, 2013]: A. K. Trilling; J. Beekwilder; H. Zuilhof, *Analyst* 138 (2013) 1619–1627.
- [Triulzi, 2016]: T. Triulzi; G. V. Bianchi; E. Tagliabue, *Future Oncol*. 12 (2016) 1413–1428.
- [Tsumoto, 2007]: K. Tsumoto; D. Ejima; A. M. Senczuk; Y. Kita; T. Arakawa, *J Pharm Sci*. 96 (2007) 1677–1690.
- [Turkington, 2014]: R.C. Turkington; D. B. Longley; W. L. Allen; L. Stevenson; K. McLaughlin; P. D. Dunne; J. K. Blayney; M. Salto-Tellez; S. Van Schaeybroeck; P. G. Johnston, *Cell Death and Disease* 5 (2014) e1046; DOI:10.1038/cddis.2014.10.
- [Turner, 2013]: A. P. F. Turner, *Chem Soc Rev*. 42 (2013) 3184–3196.

U

[**Uludag, 2015**]: Y. Uludag; G. Köktürk, *Microchim Acta*. 182 (**2015**) 1685–1691.

[**Urbanek, 2015**]: M. O. Urbanek; A. U. Nawrocka; W. J. Krzyzosiak, *Int J Mol Sci*. 16 (**2015**) 13259–13286.

[**Urh, 2012**]: M. Urh; M. Rosenberg, *Curr Chem Genom*. 6 (**2012**) 72–78.

[**Usó, 2014**]: M. Usó; E. Jantus-Lewintre; R. Sirera; R. M. Bremnes; C. Camps, *Future Oncol*. 10 (**2014**) 2279–2292.

V

[**Valat, 2000**]: C. Valat; B. Limoges; D. Huet; J. -L. Romette, *Anal Chim Acta*. 404 (**2000**) 187–194.

[**Válóczi, 2004**]: A. Válóczy; C. Hornyik; N. Varga; J. Burgyán; S. Kauppinen; Z. Havelda, *Nucleic Acids Res*. 32 (**2004**) e175.

[**van Schooneveld, 2015**]: E. van Schooneveld; H. Wildiers; I. Vergote; P. B. Vermeulen; L. Y. Dirix; S. J. Van Laere, *Breast Cancer Res*. 17 (**2015**) 21.

[**Vargas, 2017**]: E. Vargas; R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; E. Povedano; M. Pedrero; J. J. Montoya; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Int J Mol Sci*. 18 (**2017**) E2151.

[**Vargas, 2018**]: E. Vargas; E. Povedano; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; R. M. Torrente-Rodríguez; M. Zouari; J. J. Montoya; N. Raouafi; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Sensors* 18 (**2018**) 863.

[**Vargason, 2003**]: J. M. Vargason; G. Szittyá; J. Burgyán; T. M. Hall, *Cell* 115 (**2003**) 799–811.

[**Vasilescu, 2016**]: A. Vasilescu; G. Nunes; A. Hayat; U. Latif; J-L. Marty, *Sensors* 16 (**2016**) 1863.

[**Venkataraman, 2007**]: S. Venkataraman; R. M. Dirks; P. W. Rothmund; E. Winfree; N. A. Pierce, *Nat Nanotechnol*. 2 (**2007**) 490–494.

[**Vestergaard, 2007**]: M. Vestergaard; K. Kerman; E. Tamiya, *Sensors* 7 (**2007**) 3442–3458.

[**Visone, 2007**]: P. Visone; P. Pallante; A. Vecchione; R. Cirombella; M. Ferracin; A. Ferraro; S. Volinia; S. Coluzzi; V. Leone; E. Borbone; C. G. Liu; F. Petrocca; G. Troncone; G. A. Calin; A. Scarpa; C. Colato; G. Tallini; M. Santoro; C. M. Croce; A. Fusco, *Oncogene* 26 (**2007**) 7590–7595.

W

[**Wagner, 2004**]: P. D. Wagner; M. Verma; S. Srivastava, *S Ann N Y Acad Sci*. 1022 (**2004**) 9–16.

[**Wang, 2001**]: J. Wang; A-N. Kawde; A. Erdem; M. Salazar, *Analyst* 126 (**2001**) 2020–2024.

[**Wang, 2008^a**]: Y. Wang; H. Xu; J. Zhang; G. Li, *Sensors* 8 (**2008**) 2043–2081.

[Wang, 2008^b]: W-X. Wang; B. W. Rajeev; A. J. Stromberg; N. Ren; G. Tang; Q. Huang; I. Rigoutsos; P. T. Nelson, *J Neurosci.* 28 (2008) 1213–1223.

[Wang, 2012]: W. Wang; N. D. Walker; L-J. Zhu; W. Wu; L. Ge; D. E. Gutstein; N. A. Yates; R. C. Hendrickson; M. L. Ogletree; M. Cleary; G. J. Opiteck; Z. Chen, *Anal Chem.* 84 (2012) 6891–6898.

[Wang, 2013^a]: Z. Wang; H. Liao; Z. Deng; P. Yang; N. Du; Y. Zhanng; H. Ren, *Biochem Biophys Res Commun.* 441 (2013) 139–143.

[Wang, 2013^b]: D. Wang; L. Hu; H. Zhou; E. S. Abdel-Halim; J-J. Zhu, *Electrochem Comm.* 33 (2013) 80–83.

[Wang, 2013^c]: X. Wang; C. Lau; M. Kai; J. Lu, *Analyst* 138 (2013) 2691–2697.

[Wang, 2014]: F. Wang, C-H. Lu; I. Willner, *Chem Rev.* 114 (2014) 2881–2941.

[Wang, 2015^a]: W. Wang; Y-P. Luo, *J Zhejiang Univ Sci B.* 16 (2015) 18–31.

[Wang, 2015^b]: M. Wang; B. Li; Q. Zhou; H. Yin; Y. Zhou; S. Ai, *Electrochim Acta.* 20 (2015) 130–135.

[Wang, 2015^c]: M. Wang; B. Shen; R. Yuan; W. Cheng; H. Xu; S. Ding, *J Electroanal Chem.* 756 (2015) 147–152.

[Wang, 2016^a]: P. Wang; J. Zhao; B. Hu; Z. Cheng; Y. Bai; Q. Jin; H. Liu; H. Mao; S. Li; J. Zhao, *Sci China Life Sci.* 59 (2016) 510–515.

[Wang, 2016^b]: L. Wang; Q. Rong; Z. Ma, *Electroanalysis* 28 (2016) 1–9.

[Wang, 2017^a]: W. Wang, M. R. Young. (2017). MicroRNA Biomarkers for Early Detection of Cancer. En S. Srivastava (Ed.); *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection*, West Sussex, UK, John Wiley & Sons, Ltd.

[Wang, 2017^b]: S. Wang; C. M. McGuirk; M. B. Ross; S. Wang; P. Chen; H. Xing; Y. Liu; C. A. Mirkin, *J Am Chem Soc.* 139 (2017) 9827–9830.

[Wang, 2017^c]: J. Wang; Z. Lu; H. Tang; L. Wu; Z. Wang; M. Wu; X. Yi; J. Wang, *Anal Chem.* 89 (2017) 10834–10840.

[Wang, 2017^d]: Y. Wang; X. Zhang; L. Zhao; T. Bao; W. Wen; X. Zhang; S. Wang, *Biosens Bioelectron.* 98 (2017) 386–391.

[Wang, 2017^e]: W. Wang; J. Feng; Y. Ye; F. Lyu; Y.-S. Liu; J. Guo; Y. Yin, *Nano Lett.* 17 (2017) 755–761.

[Wang, 2018]: Q. Wang; H. Wei; Z. Zhang; E. Wang; S. Dong, *Trends Analyt Chem.* 105 (2018) 218–224.

[Watson, 1953]: J. D. Watson; F. H. C. Crick, *Nature* 171 (1953) 737–738.

[Watson, 2004]: J. D. Watson (2004). *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings.

[Weber, 2010]: J. A. Weber; D. H. Baxter; S. Zhang; D. Y. Huang; K. H. Huang; M. J. Lee; D. J. Galas; K. Wang, *Clin Chem.* 56 (2010) 1733–1741.

[Wei, 2008]: F. Wei; J. Wang; W. Liao; B. G. Zimmermann; D. T. Wong; C-M. Ho, *Nucleic Acid Res.* 36 (2008) e65.

[Wei, 2009]: F. Wei; P. Patel; W. Liao; K. Chaufhry; L. Zhang; M. Arellano-García; S. Hu; D. Elashoff; H. Zhou; S. Shukla; F. Shah; C-M. Ho; D. T. Wong, *Clin Cancer Res.* 15 (2009) 4446–4452.

[Weigel, 2010]: M. T. Weigel; M. Dowsett, *Endocr Relat Cancer.* 17 (2010) R245–R262.

[Weishaupt, 2013]: S. U. Weishaupt; S. Rupp; K. Lemuth, *J Nucleic Acids.* 2013 (2013). DOI: 10.1155/2013/496425.

[Weissleder, 2003]: R. Weissleder; V. Ntziachristos, *Nat Med.* 9 (2003) 123–128.

[Wen, 2014]: X. Wen; F-M. Deng; J. Wang, *Am J Clin Exp Urol.* 2 (2014) 219–230.

[Wen, 2015]: J. Wen; Y. Yang; F. Ye; X. Huang; S. Li; Q. Wang; X. Xie, *The Breast* 24 (2015) 745–750.

[Werner, 2015]: S. Werner; H. Chen; S. Tao; H. Brenner, *Int. J. Cancer.* 136 (2015) 2243–2252.

[Willner, 2008]: I. Willner; B. Shlyahovsky; M. Zayats; B. Willner, *Chem Soc Rev.* 37 (2008) 1153–1165.

[Wu, 2007]: J. Wu; Z. Fu; F. Yan; H. Ju, *Trends Analyt Chem.* 26 (2007) 679–688.

[Wu, 2015^a]: L. Wu; X. Qu, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 2963–2997.

[Wu, 2015^b]: X. Wu; Y. Chai; P. Zhang; R. Yuan, *ACS Appl Mater Interfaces.* 7 (2015) 713–720.

[Wulfkühle, 2003]: J. D. Wulfkühle; L. A. Liotta; E. F. Petricoin, *Nat Rev Cancer.* 3 (2003) 267–275.

X

[Xiong, 2012]: P. Xiong; N. Gan; Y. Cao; F. Hu; T. Li; L. Xheng, *Materials* 5 (2012) 2757–2772.

[Xiong, 2017]: H. Xiong; X. Zheng, *Microchim Acta.* 184 (2017) 1781–1789.

[Xu, 2013]: Y. Xu; D. Wang; L-M. Zhao; X-L. Zhao; J-J. Shen; Y. Xie; L-L. Cao; Z-B. Chen; Y-M. Luo; B-H. Bao; Z-Q. Liang, *Cancer Biol Ther.* 14 (2013) 937–948.

[Xu, 2016]: F. Xu; T. Yang; Y. Chen, *Anal Chem.* 88 (2016) 754–763.

Y

[Yadav, 2017]: S. Yadav; M. K. Masud; Md. N. Md. Islam; V. Gopalan; A. King-Y Lam; S. Tanaka; N-T. Nguyen; Md. S. Al Hossain; C. Li; Md. Y. Yamauchi; M. J. A. Shiddiky, *Nanoscale* 9 (2017) 8805–8814.

[Yan, 2011]: L. X. Yan; Q. N. Wu; Y. Zhang; Y. Y. Li; D. Z. Liao; J. H. Hou; J. Fu; M. S. Zeng; J. P. Yun; Q. L. Wu; Y. X. Zeng; J. Y. Shao, *Breast Cancer Res.* 13 (2011). DOI: 10.1186/bcr2803.

[Yáñez-Sedeño, 2016]: P. Yáñez-Sedeño; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Sensors* 16 (2016) 1585.

[Yáñez-Sedeño, 2017]: P. Yáñez-Sedeño; S. Campuzano; J. M. Pingarrón, *Sensors* 17 (2017) 965.

[Yang, 2014]: C. Yang; B. Dou; K. Shi; Y. Chai; Y. Xiang; R. Yuan, *Anal Chem.* 86 (2014) 11913–11918.

[Ye, 2003]: K. Ye; L. Malinina; D. J. Patel, *Nature* 426 (2003) 874–878.

[Yu, 2016^a]: X. Yu; F. Hu; Q. Yao; C. Li; H. Zhang; Y. Xue, *BMC Cancer* 16 (2016) 480.

[Yu, 2016^b]: Y. Yu; Q. Zhang; C-C. Chang; Y. Liu; Z. Yang; Y. Guo; Y. Wang; D. K. Galanakis; K. Levonb; M. Rafailovich, *Analyst* 141 (2016) 5607–5617.

[Yu, 2016^c]: X. Yu; M. Odenthal; J. W. U. Fries, *Int J Mol Sci.* 17 (2016) 2028.

[Yu, 2017]: N. Yu; Z. Wang; C. Wang; J. Han; H. Bu, *Anal Chim Acta.* 962 (2017) 24–31.

[Yuan, 2017]: Y. H. Yuan; Y. D. Wu; B. Z. Chi; R. P. Liang; J. D. Qiu, *Biosens Bioelectron.* 97 (2017) 325–331.

[Yuan, 2018]: Y-H. Yuan; B-Z. Chi; S-H. Wen; R-P. Liang; Z-M. Li; J-D. Qiu, *Biosens Bioelectron.* 102 (2018) 211–216.

Z

[Zaenker, 2013]: P. Zaenker; M. R. Ziman, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 22 (2013) 2161–2181.

[Zaenker, 2016]: P. Zaenker; E. S. Gray; M. R. Ziman, *Autoimmun Rev.* 15 (2016) 477–483.

[Zatloukal, 2014]: B. Zatloukal; I. Kufferath; A. Thueringer; U. Landegren; K. Zatloukal; J. Haybaeck, *PLoS One.* 9 (2014) e96690.

[Zeng, 2011]: S. Zeng; K-T. Yong; I. Roy; X-Q. Dinh; X. Yu; F. Luan, *Plasmonics* 6 (2011) 491–506.

[Zeng, 2012]: S. Zeng; S. Wang; L. Wang; L. Yang; Z. Chen; Z. Liang, *Sensors* 12 (2012) 13471–13479.

- [Zeng, 2017]:** D. Zeng; Z. Wang; Z. Meng; P. Wang; L. San; W. Wang; A. Aldalbahi; L. Li; J. Shen; X. Mi, *ACS Appl Mater Interfaces*. 9 (2017) 24118–24125.
- [Zhai, 2015]:** Q. Zhai; Y. He; X. Li; J. Guo; S. Li; G. Yi, *J Electroanal Chem*. 758 (2015) 20–25.
- [Zhang, 2004]:** W. Zhang; G. Li, *Anal Sci*. 20 (2004) 603–609.
- [Zhang, 2009]:** Y. Zhang; M. Li; H. Wang; W. E. Fisher; P. H. Lin; Q. Yao; C. Chen, *World J. Surg*. 33 (2009) 33 698–709.
- [Zhang, 2011]:** Y. Zhang; R. M. González; R. C. Zangar, *BMC Cancer* 11 (2011) DOI: 10.1186/1471-2407-11-69.
- [Zhang, 2012^a]:** B. Zhang; L. Hou; D. P. Tang; B.Q. Liu; J. R. Li; G. N. Chen, *J Agric Food Chem*. 60 (2012) 8974–8982.
- [Zhang, 2012^b]:** J. Zhang; Z. Xv; X. Wu, K. Li, *PLoS One*. 7 (2012) e52896.
- [Zhang, 2012^c]:** D. Y. Zhang; S. X. Chen; P. Yin, *Nat Chem*. 4 (2012) 208–214.
- [Zhang, 2014^a]:** J. Zhang; X. Xu; L. Yu; M. Chen; K. Li, *PLoS One*. 9 (2014) e99255.
- [Zhang, 2014^b]:** G. Zhang; X. Hou; Y. Li; M. Zhao, *BMC Cancer* 14 (2014) 440.
- [Zhang, 2015^a]:** H. Zhang; X. Zhang; X. Yuan; L. Wang; Y. Xiao, *Iran J Basic Med Sci*. 18 (2015) 1020–1026.
- [Zhang, 2015^b]:** L. Zhang; Z. Li, X. Zhou; G. Yang; J. Yang; H. Wang; M. Wang; C. Liang; Y. Wen; Y. Lu, *J Electroanal Chem*. 757 (2015) 203–209.
- [Zhang, 2016^a]:** W. Zhang; S. Zhu; R. Luque; S. Han; L. Hu; G. Xu, *Chem Soc Rev*. 45 (2016) 715–752.
- [Zhang, 2016^b]:** J. Zhang; D. Z. Wu; S. X. Cai; M. Chen; Y. K. Xia; F. Wu; J. H. Chen, *Biosens Bioelectron*. 75 (2016) 452–457.
- [Zhang, 2016^c]:** W. Zhang; S. Hu; J. J. Yin; W. He; W. Lu; M. Ma; N. Gu; Y. Zhang, *J Am Chem Soc*. 138 (2016) 5860–5865.
- [Zhang, 2017]:** W. Zhang; W. Xia; Z. Lv; C. Ni; Y. Xin; L. Yang, *Cell Physiol Biochem*. 41 (2017) 755–768.
- [Zhang, 2018]:** X. Zhang; Z. Yang; Y. Chang; M. Qing; R. Yuan; Y. Chai, *Anal Chem*. 90 (2018) 9538–9544.
- [Zhao, 2010]:** G. C. Zhao; X. Yang, *Electrochem Commun*. 12 (2010) 300–302.
- [Zheng, 2014]:** F. Zheng; Y. Cheng; J. Wang; J. Lu; B. Zhang; Y. Zhao; Z. Gu, *Adv Mater*. 26 (2014) 7333–7338.
- [Zhou, 2009]:** Y. Zhou; Z. Wang; W. Yue; K. Tang; W. Ruan; Q. Zhang; L. Liu, *IEEE Sensors*. (2009) 819–822.
- [Zhou, 2017]:** Y. Zhou; B. Liu; R. Yang; J. Liu, *Bioconjugate Chem*. 28 (2017) 2903–2909.

[Zhu, 2014]: D. Zhu; Y. Yan; P. Lei; B. Shen; W. Cheng; H. Ju; S. Ding, *Anal Chim Acta*. 846 (2014) 44–50.

[Zhu, 2015]: Q. Zhu; Y. Chai; Y. Zhuo; R. Yuan, *Biosens Bioelectron*. 68 (2015) 42–48.

[Zhu, 2018]: D. Zhu; W. Liu; W. Cao; J. Chao; S. Su; L. Wang; C. Fan, *Electroanalysis* 30 (2018) 1–9.

[Zouari, 2018^a]: M. Zouari; S. Campuzano; J. M. Pingarrón; N. Raouafi, *Electrochim Acta*. 262 (2018) 39–47.

[Zouari, 2018^b]: M. Zouari; S. Campuzano; J. M. Pingarrón; N. Raouafi, *ACS Omega* 3 (2018) 8923–8931.

7. RESUMEN EN INGLÉS

VERSATILE ELECTROANALYTICAL BIOPLATFORMS FOR EARLY AND RELIABLE CANCER DIAGNOSIS AT DIFFERENT MOLECULAR LEVELS

7.1. INTRODUCTION

From the ancient Egyptians to the present day, cancer is one of the most terrible enemies that has been part of the human history.

As a response to the presence, development, relief and reoccurrence of a neoplasia, both cancerous and non-cancerous cells release a wide variety of molecular entities, including proteins, genes and epigenetic alterations, known as biomarkers, which are detectable in many biological specimens and bodily fluids. The alteration/deregulation of specific biomarkers provides substantial information for the identification and classification even at early stages of a specific tumor, evaluation of a possible relapse after a treatment, and prediction of the successful response to a certain applied therapy.

At present, sensitive and selective determination of molecular profiles comprising specific circulating protein antigens, extracellular receptors and miRNAs results of high relevance to accomplish these purposes. MiRNAs, small non-coding RNAs involved in essential biological processes through the regulation of the gene expression at the post-transcriptional level, are considered as a pivotal part of the epigenetic machinery and, due to their deregulation during the onset and course of pathological states, such as cancer, are considered one of the most effective and promising biomarkers for the early detection of incoming malignant transformations.

Accordingly, the characterization of particular molecular signatures for any type/stage of tumor through accurate detection of specific biomarkers at the early stages of carcinogenesis and along the different steps of the disease, is envisaged as the first step towards an efficient personalized medicine, decreasing the mortality rate and providing a better quality of life to patients.

7.2. AIMS OF THIS WORK

The main objective of this Thesis is the design, development and application of simple and novel biosensing devices for single and/or simultaneous determination of emerging

clinical relevance protein and gene-related circulating biomarkers associated with the initiation and progression of breast, colon and oral cancer in a wide variety of biological matrices and clinical specimens from different complexity (serum, saliva, cells and total RNA extracts (RNA_t)). The developed methodologies presented along this Thesis smartly combine different affinity receptors and scarcely explored bioassays strategies, commercial magnetic beads (MBs) and amperometric detection at screen-printed carbon electrodes (SPCEs) in easy to use biosensing platforms, with reduced analysis time and easily adaptable to multiplexing and on-site analysis, which offer excellent analytical performance and demonstrate pioneer and relevant applications for the accurate determination of the target biomarkers in complex samples after minimal sample treatments. These important features make the developed methodologies reliable and robust diagnosis and prognosis bioanalytical tools for their future implementation in clinical routine.

7.3. RESEARCH RESULTS

The first part of this Thesis includes the discussion of the most relevant research results obtained in the development of:

- five amperometric immunoplatforms based on the use of specific antibodies and recombinant proteins for the determination of relevant protein-related cancer biomarkers: fibrinogen, endoglin (CD105), fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), human epidermal growth factor 2 (HER-2) and p53 autoantibodies
- four novel amperometric strategies, free from previous amplification processes, for miRNAs determination based on the combination of DNA and RNA synthetic sequences and commercial high versatile affinity receptors very little explored at the beginning of this Thesis, including viral proteins and specific antibodies showing high affinity against RNA homo- and heterohybrids (RNA–RNA and DNA–RNA), respectively
- one methodology for the amperometric determination of miRNAs based on an isothermal amplification strategy (which can be easily implemented in POC devices) involving the use of DNA sequences and sequential amplification processes that are triggered only in the presence of the specific target

- two biosensing dual platforms applicable to the simultaneous detection of relevant miRNAs with opposite biological roles in breast cancer based on the use of viral proteins and selective antibodies as affinity capture bioreceptors
- one novel dual biosensing platform for the simultaneous determination of biomarkers from different nature: IL-8 protein and its associated messenger RNA, highly useful for non-invasive diagnosis, based on specific antibodies and DNA sequences

The last part of this Thesis includes the most remarkable results obtained during the predoctoral stay abroad which this scholarship has allowed me to enjoy, regarding the evaluation of the catalytic properties of Prussian Blue nanoparticles (PBNPs) and other structural analogs as effective artificial enzymes in H₂O₂-dependent oxidative systems of high interest. It is worthy to mention that, as HRP/H₂O₂ system was employed as enzymatic substrate in the amperometric transduction of all biosensing methodologies presented in this Thesis, future comparative studies between the native and synthesized nanoparticles as artificial enzymes could be envisioned in the future.

7.4. MILESTONES

The most outstanding achievements that have been reached during the performance of this Thesis include:

- i) the development of the first immunosensor for the determination of FGFR4 in raw cell lysates
- ii) the coupling, for the first time, of HaloTag technology and MBs for direct *in vitro* expression of recombinant proteins and the development of an electrochemical biosensor for monitoring the humoral immune response through p53 autoantibodies determination
- iii) the development of two patented methodologies for the sensitive and selective determination of miRNAs
- iv) pioneer applications of electrochemical biosensors for direct determination of extracellular receptors (HER-2) in entire cells as well as miRNAs determination in paraffin embedded tissues

The overall research studies conducted within the framework of this Doctoral Thesis, in which I have actively participated, have demonstrated for the first time the capabilities of electrochemical biosensors for the accurate, individual or simultaneous, determination of high relevant biomarkers from different molecular level for the early cancer diagnosis and prognosis. All these high impact achievements have pushed the boundaries of electrochemical biosensors towards unexplored applications so far and demonstrate that, in conjunction with the research group to which I belong, I have contributed to open a pioneer work line focused on the development of new biosensing concepts for the implementation of analytical devices capable of complementing the results provided by conventional methodologies to improve the diagnosis and prognosis of oncological pathologies.

8. RESUMEN EN ESPAÑOL

BIOPLATAFORMAS ELECTROANALÍTICAS VERSÁTILES PARA DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y FIABLE DE CÁNCER A DIFERENTES NIVELES MOLECULARES

8.1. INTRODUCCIÓN

Desde los antiguos egipcios hasta nuestros días, el cáncer es uno de los peores enemigos de la salud en la historia de la humanidad.

Como respuesta a la presencia, desarrollo, mitigación y reincidencia de una neoplasia, las células (tanto cancerosas como sanas) liberan entidades moleculares detectables en todo tipo de especímenes y fluidos biológicos, conocidas como biomarcadores, que incluyen proteínas, genes y alteraciones epigenéticas, y cuya alteración y/o desregulación permite detectar de forma temprana, identificar y clasificar distintas variantes de cáncer, evaluar el riesgo de recaída tras un tratamiento, y predecir la respuesta a ciertas terapias aplicadas.

En la actualidad resultan de especial relevancia para estos propósitos la determinación sensible y selectiva de firmas moleculares que incluyen antígenos proteicos circulantes, receptores extracelulares y miRNAs. Los miRNAs, pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional y que conforman uno de los pilares fundamentales de la maquinaria epigenética, se encuentran alterados durante el inicio y progreso de la enfermedad y se consideran unos de los biomarcadores más prometedores para la detección de transformaciones malignas incipientes.

La elucidación de los perfiles moleculares específicos de un tumor mediante la detección precisa de biomarcadores circulantes se presenta como el primer paso hacia una medicina personalizada de precisión que permita seleccionar los tratamientos más adecuados en cada caso, reduciendo la tasa de mortalidad y ofreciendo una mejor calidad de vida a los pacientes.

8.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el diseño, desarrollo y aplicación de herramientas biosensoras sencillas y novedosas para la determinación individual y/o simultánea de biomarcadores circulantes proteicos y genéticos de relevancia clínica emergente relacionados con la aparición y evolución del cáncer de mama, colon y oral en

matrices biológicas de diversa complejidad (suero, saliva, células y extractos de RNA total (RNA_t)). Las metodologías presentadas a lo largo de esta Tesis Doctoral, combinan de una manera inteligente receptores de afinidad y formatos de bioensayo poco explorados hasta la fecha, partículas magnéticas comerciales (MBs) y transducción amperométrica sobre electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs), en rápidas y sencillas bioplateformas fácilmente trasladables a sistemas de multidetección *in situ*, demostrando aplicaciones pioneras y relevantes para la determinación fiable de los biomarcadores de interés en muestras complejas tras mínimos pretratamientos, convirtiéndolas en herramientas fiables y robustas para su futura implementación en la rutina hospitalaria.

8.3. RESULTADOS

En la primera parte de esta Tesis Doctoral se discuten los resultados de mayor impacto obtenidos en el desarrollo de:

- cinco inmunoplateformas amperométricas basadas en el empleo de anticuerpos específicos y proteínas recombinantes para la determinación de biomarcadores proteicos de relevancia emergente en cáncer: fibrinógeno, endoglina (CD105), receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER-2) y autoanticuerpos específicos al supresor tumoral p53
- cuatro novedosas estrategias amperométricas para la determinación de miRNAs, sin requerir procesos previos de amplificación, combinando secuencias sintéticas de DNA, RNA y receptores de afinidad comerciales y poco explorados al comienzo de esta Tesis Doctoral, que incluyen proteínas virales y anticuerpos específicos con elevada afinidad para el reconocimiento de homo- y heterohíbridos de RNA (RNA-RNA y DNA-RNA), respectivamente
- una metodología para la determinación amperométrica de miRNAs basada en una estrategia de amplificación isoterma (fácilmente implementable en dispositivos POC) que involucra secuencias de DNA y procesos de amplificación secuencial que ocurren únicamente en presencia del analito diana de interés
- dos plataformas biosensoras duales para la interrogación simultánea de miRNAs relevantes con funciones biológicas opuestas en cáncer de mama, basadas en el

empleo de proteínas virales y anticuerpos selectivos como bio-receptores de afinidad de captura

- una novedosa plataforma biosensora dual para la determinación de biomarcadores de distinta naturaleza: la proteína IL-8 y su RNA mensajero asociado, de gran utilidad clínica para el diagnóstico no invasivo, empleando anticuerpos específicos y secuencias de DNA

En la última parte de esta Tesis Doctoral se incluyen los resultados más destacables obtenidos durante la estancia en el extranjero de la que me ha permitido disfrutar esta beca, en la evaluación de las propiedades catalíticas de nanopartículas de Azul de Prusia (PBNPs) y sus análogos estructurales como enzimas artificiales efectivas en importantes sistemas oxidativos dependientes de H_2O_2 . Cabe destacar el empleo del sistema HRP/ H_2O_2 como sustrato enzimático en la transducción amperométrica de todas las metodologías desarrolladas en esta Tesis Doctoral, por lo que en el futuro podrían plantearse estudios comparativos con la enzima nativa y las nanopartículas preparadas como enzimas artificiales.

8.4. LOGROS

Los logros más destacables alcanzados durante la ejecución y desarrollo de esta Tesis Doctoral incluyen:

- i) desarrollo del primer inmunosensor para la determinación de FGFR4 en lisados celulares
- ii) primer acoplamiento de la tecnología HaloTag sobre MBs para la expresión *in vitro* de proteínas recombinantes y el desarrollo de un biosensor electroquímico para la monitorización de la respuesta inmune humoral a través de la determinación de autoanticuerpos específicos a p53
- iii) desarrollo de dos metodologías patentadas para la determinación sensible y selectiva de miRNAs
- iv) aplicaciones pioneras de biosensores electroquímicos para la determinación de receptores extracelulares (HER-2) directamente en células enteras y de miRNAs en tejidos embebidos en parafina

Las investigaciones realizadas en el marco de esta Tesis Doctoral y en las que he participado activamente, han demostrado por primera vez la posibilidad de utilizar biosensores electroquímicos para la determinación fiable (individual y simultánea) de biomarcadores de diferente nivel molecular y de gran relevancia para el diagnóstico temprano y pronóstico de cáncer. Todos estos logros de gran relevancia han empujado los límites de los biosensores electroquímicos hasta aplicaciones inexploradas hasta el momento y demuestran que, junto con el grupo de investigación al que pertenezco, he contribuido a abrir una línea pionera de trabajo enfocada al desarrollo de nuevos conceptos de biosensorización para la implementación de herramientas analíticas competentes y complementarias a las metodologías convencionales de análisis disponibles con el fin de mejorar el diagnóstico y pronóstico de enfermedades oncológicas.

9. DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Como se detalla a continuación, la relevancia y calidad de las investigaciones realizadas durante esta Tesis Doctoral han permitido la publicación de 14 trabajos revisados por pares en revistas internacionales de medio-alto impacto, la concesión de 2 Patentes PCT, la presentación de 32 comunicaciones (9 invitadas, 15 orales y 8 póster) a 26 Congresos (5 internacionales, 12 europeos y 9 nacionales) y la firma de dos Art. 83 con empresas interesadas en la Tecnología desarrollada. Es importante destacar, además, que una de las publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral (la publicación nº 10) ha recibido un Premio por ser uno de los tres mejores artículos de investigación publicado durante el 2018 en la revista *International Journal of Molecular Sciences*. Por otro lado y en el marco del Art. 83 todavía vigente hasta diciembre de 2019 con la empresa miRNAx Biosensores S.L., se encuentra en fase de desarrollo bastante avanzado una plataforma automatizada basada en un sistema de microfluídica para la determinación de miRNAs que por su versatilidad puede trasladarse de manera sencilla a la determinación de analitos de diferente nivel molecular cumpliendo con los requerimientos de sencillez de manejo y tiempo de ensayo requeridos en la rutina hospitalaria.

Publicaciones internacionales:

1. R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; M. Gamella; F. Conzuelo; A. J. Reviejo; J. M. Pingarrón. **“Amperometric disposable magnetoimmunosensor for the determination of fibrinogen in plasma”**. *Chemical Sensors*, 4 (2014) 7.
Índice de impacto (2018): 2.475.
2. R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; V. Ruiz-Valdepeñas-Montiel; M. Pedrero; M. J. Fernández-Aceñero; R. Barderas; J. M. Pingarrón. **“Rapid endoglin determination in serum samples using an amperometric magneto-actuated disposable immunosensing platform”**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129 (2016) 288–293.
Índice de impacto (2018): 2.831.
3. R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; M. Pedrero; M. Farchado; E. Vargas; F. J. Manuel de Villena; M. Garranzo-Asensio; R. Barderas; J. M. Pingarrón. **“Electrochemical Sensor for Rapid Determination of Fibroblast**

Growth Factor Receptor 4 in Raw Cancer Cell Lysates". *PLoS One*, 12 (2017) e0175056.

Índice de impacto (2018): 2.766.

4. U. Eletxigerra; J. Martinez-Perdiguerro; S. Merino; R. Barderas; R. M. Torrente-Rodríguez; R. Villalonga; J. M. Pingarrón; S. Campuzano. **"Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells". *Biosensors & Bioelectronics*, 70 (2015) 34–41.**

Índice de impacto (2018): 8.173.

5. M. Garranzo-Asensio; A. Guzman-Aranguez; C. Povés; M. J. Fernández-Aceñero; R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; G. Domínguez; L. San Frutos; N. Rodríguez; M. Villalba; J. M. Pingarrón; S. Campuzano; R. Barderas. **"Toward Liquid Biopsy: Determination of the Humoral Immune Response in Cancer Patients Using HaloTag Fusion Protein-Modified Electrochemical Bioplatfoms". *Analytical Chemistry*, 88 (2016) 12339–12345.**

Índice de impacto (2018): 6.042.

6. S. Campuzano; R. M. Torrente-Rodríguez; E. López-Hernández; F. Conzuelo; R. Granados; J. M. Sánchez-Puelles; J. M. Pingarrón. **"Magnetobiosensors Based on Viral Protein p19 for MicroRNA Determination in Cancer Cells and Tissues". *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (2014) 6168–6171.**

Índice de impacto (2018): 12.102.

7. R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, E. López-Hernández, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. **"Direct determination of miR-21 in total RNA extracted from breast cancer samples using magnetosensing platforms and the p19 viral protein as detector bioreceptor". *Electroanalysis*, 26 (2014) 2080–2087.**

Índice de impacto (2018): 2.851.

8. R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; S. Campuzano; M. Farchado-Dinia; R. Barderas; P. San Segundo-Acosta; J. J. Montoya, J. M. Pingarrón. **“Fast Electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody functionalized magnetic microcarriers”**. *ACS Sensors*, 1 (2016) 896–903.
Índice de impacto (2018): 5.711.

9. R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; A. Sagrera; J. J. Domínguez-Cañete; E. Vargas; J. J. Montoya; R. Granados; J. M. Sánchez-Puelles; J. M. Pingarrón. **“Electrochemical Mirnas Determination in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Tumor Tissues Association with HER2 Expression”**. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 3 (2016) 1064.
Índice de impacto (2018): —

10. E. Vargas; R. M. Torrente-Rodríguez; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; E. Povedano; M. Pedrero; J. J. Montoya; S. Campuzano; J. M. Pingarrón. **“Magnetic Beads-Based Sensor with Tailored Sensitivity for Rapid and Single-Step Amperometric Determination of miRNAs”**. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 2151; DOI:10.3390/ijms18112151.
Índice de impacto (2018): 3.687.

11. R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; J. J. Montoya; J. M. Pingarrón. **“Sensitive electrochemical determination of miRNAs based on a sandwich assay onto magnetic microcarriers and hybridization chain reaction amplification”**. *Biosensors & Bioelectronics*, 86 (2016) 516–521.
Índice de impacto (2018): 8.173.

12. R. M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, E. López-Hernández, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Barderas, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón. **“Simultaneous detection of two breast cancer-related miRNAs in tumor tissues using p19-based disposable amperometric magnetobiosensing platforms”**. *Biosensors & Bioelectronics*, 66 (2015) 385–391.
Índice de impacto (2018): 8.173.
13. R. M. Torrente-Rodríguez; S. Campuzano; V. Ruiz-Valdepeñas Montiel; M. Gamella; J. M. Pingarrón. **“Electrochemical bioplatfoms for the simultaneous determination of interleukin (IL)-8 mRNA and IL-8 protein oral cancer biomarkers in raw saliva”**. *Biosensors & Bioelectronics*, 77 (2016) 543–548.
Índice de impacto (2018): 8.173.
14. M. Vázquez-González; R. M. Torrente-Rodríguez; A. Kozell; W-C. Liao; A. Cecconello; S. Campuzano; J. M. Pingarrón; I. Willner. **“Mimicking peroxidase activities with Prussian Blue nanoparticles and their cyanometallate structural analogs”**. *Nano Letters*, 17 (2017) 4958–4963.
Índice de impacto (2018): 12.080.

Comunicaciones a Congresos:

1. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, J.M. Sánchez-Puelles, J.M. Pingarrón.
Título: Viral protein p19-based magnetobiosensors for miRs determination in cancer cells.
Tipo de participación: Comunicación oral.
Congreso: 15th International Conference on Electroanalysis, ESEAC.
Publicación: Book of Abstracts.
Lugar y fecha de celebración: Malmö, (Sweden) 11–15 Junio 2014.

2. Autores: R. Granados, S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, J.M. Sánchez-Puelles, J.J. Domínguez, J.M. Jover, J.M. Pingarrón.

Título: MicroRNA-21 detected in breast cancer tissue and cells by a new electrochemical magnetobiosensor: A rapid, sensitive, accurate and unexpensive alternative to other molecular approaches.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 26th European Congress of Pathology, ExCel.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: London (United Kingdom), 30 Agosto–3 Septiembre 2014.

3. Autores: R. Granados, S. Campuzano, J.J. Domínguez-Cañete, R.M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, A. Carabias, J.M. Pingarrón, J.M. Sánchez Puelles.

Título: Detection of microRNA-21 in liquid-based cytology from breast cancer samples by a novel magnetobiosensor technique. Correlation to clinicopathological variables.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: 38th European Congress of Cytology.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: Geneve (Switzerland), 27–30 Septiembre 2014.

4. Autores: J.-M. Sánchez-Puelles, S. Campuzano, E. López, R.M. Torrente-Rodríguez, F. Conzuelo, R. Granados, J. M. Pingarrón.

Título: New magnetobiosensors for miRs determination in cancer cells and tissues.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Translational advances in cancer cell signalling and metabolism. EMBO Workshop.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Bilbao (España), 7–9 Octubre 2014.

5. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, B. Esteban-Fernández de Ávila, R. Barderas, M. Pedrero, R. Villalonga, J.M. Pingarrón.

Título: Advanced electrochemical bioplatfroms for early detection, diagnosis and prognosis of cancer.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: SYLICA Workshop on electrochemical analysis of biomolecules and its applications in diagnostics.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Brno (República Checa), 19–20 Febrero 2015.

6. Autores: R. Granados, S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, E. López Hernández, Juan J. Domínguez-Cañete, José M. Pingarrón, José M. Sánchez-Puelles.

Título: Simultaneous detection of miRNA-21 and miRNA-205 in breast cancer tissue by a novel magnetobiosensor.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 2015 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting.

Publicación: Modern Pathology 2015; 28(supp2):514A.

Lugar y fecha de celebración: Boston (EEUU.), 21–27 Marzo 2015.

7. Autores: U. Elexigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, R.M. Torrente-Rodríguez, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, S. Campuzano.

Título: ErbB2 breast cancer biomarker electrochemical determination in human serum, cell lysates and breast cancer cells.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 4th International Conference on Bio-Sensing Technology.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: Lisbon (Portugal), 10–13 Mayo 2015.

8. Autores: Juan J. Domínguez-Cañete, S. Campuzano, E. López Hernández, R.M. Torrente-Rodríguez, R. Barderas, V. Ruiz-Valdepeñas, José M. Pingarrón, José M. Sánchez-Puelles, R. Granados.

Título: Detección simultánea de microRNAs 21 y 205 en cáncer de mama, mediante un nuevo magnetobiosensor electroquímico. Expresión de estos marcadores de agresividad en tumores HER2/neu positivos.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXVII Congreso Nacional SEAP-IAP.

Publicación: Libro de Resúmenes.

Lugar celebración: Santander (España), 19–23 Mayo 2015.

9. Autores: José M. Pingarrón, Susana Campuzano, María Pedrero, Rebeca M. Torrente-Rodríguez.

Título: Advanced electrochemical bioplatfroms for detection and diagnosis of cancer biomarkers.

Tipo de participación: Conferencia invitada.

Congreso: XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: Santiago de Compostela (España), 1–3 Julio 2015.

10. Autores: José M. Pingarrón, Susana Campuzano, María Pedrero and Rebeca M. Torrente-Rodríguez.

Título: Promising scaffolds for electrochemical biosensing of breast cancer reporters.

Tipo de participación: Keynote lecture.

Congreso: Euroanalysis 2015.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: Bordeaux (Francia), 6–10 Septiembre 2015.

11. Autores: Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Susana Campuzano, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, María Gamella, Á. Julio Reviejo and José M. Pingarrón.

Título: Simultaneous detection of two salivary cancer biomarkers: Interleukin (IL)-8 mRNA and IL-8 protein using novel electrochemical bioplatfroms.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Euroanalysis 2015.

Publicación: Book of Abstracts.

Lugar y fecha de celebración: Bordeaux (Francia), 6–10 Septiembre 2015.

12. Autores: José Manuel Pingarrón, Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel.

Título: Advanced electrochemical scaffolds for multiplexed biosensing of cancer reporters in complex clinical samples.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: BIOSENSORS 2016.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Gotenburg (Sweden), 25–27 Mayo 2016.

13. J.M. Pingarrón, R.M. Torrente-Rodríguez, S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Barderas.

Título: Multiplexing of cancer reporters in complex samples using advanced electrochemical scaffolds.

Tipo de participación: Invited oral presentation.

Congreso: 16th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2016).

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Bath (United Kingdom), 12–16 Junio 2016.

14. Autores: Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Rodrigo Barderas, José M. Pingarrón.

Título: Bioplataformas electroanalíticas rápidas y sencillas para diagnóstico temprano de cáncer.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: XXXVII Reunión del Grupo de Electroquímica.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Alicante (España), 17–20 Julio 2016.

15. Autores: José M. Pingarrón, Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel.

Título: Advanced Electrochemical Platforms for Single and Multiplexed Determination of Cancer Reporters in practical samples.

Tipo de participación: Keynote Presentation.

Congreso: 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: The Hague, (The Netherlands), 21–26 Agosto 2016.

16. Autores: José Manuel Pingarrón, Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Rodrigo Barderas.

Título: Advanced electrochemical biosensing of cancer biomarkers.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: Batsheva de Rothschild Seminar on new Concepts in Biosensing.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Dead Sea (Israel), 12–16 Febrero 2017.

17. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, R. Barderas, J.M. Pingarrón.

Título: Electrochemical sensing of biomarkers for early detection of cancer using molecular biosensors.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: 1st European & 10th German BioSensor Symposium.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Potsdam (Alemania), 20–23 Marzo 2017.

18. Autores: J.M. Pingarrón, S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, R. Barderas.

Título: Electroanalytical bioplatforms for accurate, simple and rapid determination of early diagnosis cancer biomarkers in solid and liquid biopsies.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Sitges, Barcelona (España), 25–29 Junio 2017.

19. Autores: R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Pedrero, M. Farchado, E. Vargas, F. J. Manuel de Villena, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, J.M. Pingarrón.

Título: Amperometric immunoassay for the rapid determination of FGFR4 in raw cancer cell lysates.

Tipo de participación: Póster. Premio a Poster patrocinado por la Editorial Reverté.

Congreso: XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Sitges, Barcelona (España), 25–29 Junio 2017.

20. M. Vázquez-González, R.M. Torrente-Rodríguez, A. Kozell, W.-C. Liao, A. Cecconello, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, I. Willner.

Título: Mimicking Peroxidase Activities with Prussian Blue Nanoparticles and their Cyanometalate Structural Analogs. Application to different H₂O₂ driven-chemical transformations.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: The Hebrew University Center for Nanoscience and Nanotechnology Annual Conference 2017.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Israel, 2–3 Julio 2017.

21. Autores: J.M. Pingarrón, S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, R. Barderas.

Título: Biosensado electroanalítico fiable y no invasivo de biomarcadores de estadios tempranos de cáncer.

Tipo de participación: Conferencia Plenaria.

Congreso: XXXVIII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Vitoria-Gasteiz (España), 5–7 Julio 2017.

22. Autores: R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Pedrero, F.J. Manuel de Villena, E. Vargas, R. Barderas, J.M. Pingarrón.

Título: Inmunosensores amperométricos para la determinación rápida y sencilla de biomarcadores proteicos de relevancia en cáncer.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: XXXVIII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Vitoria-Gasteiz (España), 5–7 Julio 2017.

23. Autores: José M. Pingarrón, Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Eva Vargas, Rodrigo Barderas.

Título: Reliable and Non-invasive Electroanalytical Biosensing of Cancer Biomarkers for Early Diagnosis.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: 68th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Providence, Rhode Island, (USA), 27 Agosto–1 Septiembre 2017.

24. Autores: J.M. Pingarrón, S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, R. Barderas.

Título: Improving cancer outcomes through electrochemical biosensing of early diagnosis/prognosis biomarkers in human biopsies.

Tipo de participación: Keynote.

Congreso: 5th International Symposium on Sensor Science (i3s2017Barcelona).

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Barcelona (España), 27–29 Septiembre 2017.

25. Autores: M. Pedrero, C. Muñoz-San Martín, R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, F. J. Manuel de Villena, R. Barderas, S. Campuzano, J. M. Pingarrón.

Título: Amperometric immunosensing scaffolds for rapid, simple, non-invasive and accurate determination of protein biomarkers of well-accepted and emerging clinical importance.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 5th International Symposium on Sensor Science (i3s2017Barcelona).

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Barcelona (España), 27–29 Septiembre 2017.

26. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Barderas, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón.

Título: Nuevas plataformas de biosensado electroanalítico fiable a diferentes niveles moleculares para seguridad alimentaria y diagnóstico temprano de cáncer.

Tipo de participación: Comunicación oral invitada.

Congreso: XIV Reunión IberNAM “Microsistemas y Nanotecnología”.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Tordesillas (España), 28–29 Septiembre 2017.

27. Autores: M. Vázquez-González, R.M. Torrente-Rodríguez, A. Kozell, W.-C. Liao, A. Cecconello, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Itamar Willner.

Título: Actividad catalítica tipo peroxidasa de nanopartículas azul de prusia y sus análogos estructurales.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: II Workshop on electrochemical devices, II Workshop Electrobionet.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Mieres (España), 9–10 Noviembre 2017.

28. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, E. Povedano, M. Pedrero, R. Barderas, J.M. Pingarrón.

Título: Biosensado electroanalítico fiable, temprano y mínimamente invasivo de cáncer a diferentes niveles moleculares.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: II Workshop on electrochemical devices, II Workshop Electrobionet.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Mieres (España), 9–10 Noviembre 2017.

29. Autores: José M. Pingarrón, Susana Campuzano, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Eva Vargas, Eloy Povedano.

Título: Electrochemical biosensing of epigenetic biomarkers for early detection of cancer.

Tipo de participación: Comunicación oral invitada.

Congreso: 23rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Vilnius (Lithuania), 8–11 Mayo 2018.

30. Autores: Susana Campuzano, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Eloy Povedano, Eva Vargas, Rebeca M. Torrente-Rodríguez, María Pedrero, A. Julio Reviejo, José M. Pingarrón.

Título: Simply handy and tailored sensitivity electrochemical DNA/RNA biosensing methodologies.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: 23rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Vilnius (Lithuania), 8–11 Mayo 2018.

31. Autores: S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, M. Pedrero, R. Barderas, J.M. Pingarrón.

Título: Versatile multi-analyte electroanalytical bioplatfroms for non-invasive and reliable clinical diagnosis at different molecular levels.

Tipo de participación: Keynote.

Congreso: 17th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2018.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Rodas (Grecia), 3–7 Junio 2018.

32. Autores: Pingarrón, J.M., Campuzano, S., Torrente-Rodríguez, R.M., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Vargas, E., Povedano, E., Pedrero, M.

Título: Simple, reliable and versatile electroanalytical bioplatforms for early diagnosis of cancer at different molecular levels.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: ISOPS 12 International Symposium on Pharmaceutical Sciences.

Publicación: —

Lugar y fecha de celebración: Ankara (Turquía), 26–29 Junio 2018.

Patentes:

1. Inventores (p.o. de firma): José Manuel Pingarrón, Susana Campuzano, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Rebeca Magnolia Torrente-Rodríguez, Juan José Montoya.

Título: “Magnetic beads-based electrochemical biosensor”.

Nº publicación internacional: WO/2017/137192

Nº aplicación internacional: PCT/EP2017/050348

Fecha publicación internacional: 17 Agosto 2017

Entidad titular: Mirnax Biosens, S.L.

2. Inventores (p.o. de firma): José Manuel Pingarrón, Susana Campuzano, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Rebeca Magnolia Torrente-Rodríguez, Eva Vargas Orgaz, Juan José Montoya.

Título: “Electrochemical biosensor for the detection of nucleic acids”.

Nº publicación internacional: WO2018/197725

Nº aplicación internacional: PCT/EP2018/061037

Fecha publicación internacional: 1 Noviembre 2018

Entidad titular: Mirnax Biosens, S.L.

Art. 83 firmados con empresas:

1. Proyecto Art 83 con CANNAN RESEARCH & INVESTMENT S.L.

Título del proyecto: “Implementación y validación de magnetobiosensores electroquímicos para la determinación de microRNAs en muestras clínicas”.

Investigadora principal: Susana Campuzano Ruiz.

Duración: 18/07/2015-7/10/2016. Cuantía de la subvención: 35,000.00 €.

2. Proyecto Art. 83 con Mirnax Biosens S.L. (51/2017).

Título del proyecto: “Implementación y validación de biosensores electroquímicos para la determinación de miRNAs e integración en una plataforma biosensora automatizada basada en un sistema de microfluídica”.

Investigadora principal: Susana Campuzano Ruiz.

Duración: 01/01/2017-31/12/2019. Cuantía de la subvención: 181.324,5 €.



US 20190048402A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
PINGARRÓN et al.(10) **Pub. No.: US 2019/0048402 A1**(43) **Pub. Date: Feb. 14, 2019**(54) **MAGNETIC BEADS-BASED
ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR**(71) Applicant: **Mirna Biosens, S.L.**, Córdoba (ES)(72) Inventors: **José Manuel PINGARRÓN**, Madrid (ES); **Susana CAMPUZANO**, Madrid (ES); **Victor RUIZ-VALDEPEÑAS-MONTIEL**, Madrid (ES); **Rebeca Magnolia TORRENTE-RODRÍGUEZ**, Madrid (ES); **Juan José MONTTOYA**, Madrid (ES)(21) Appl. No.: **16/076,661**(22) PCT Filed: **Jan. 9, 2017**(86) PCT No.: **PCT/EP2017/050348**

§ 371 (c)(1),

(2) Date: **Aug. 8, 2018**(30) **Foreign Application Priority Data**

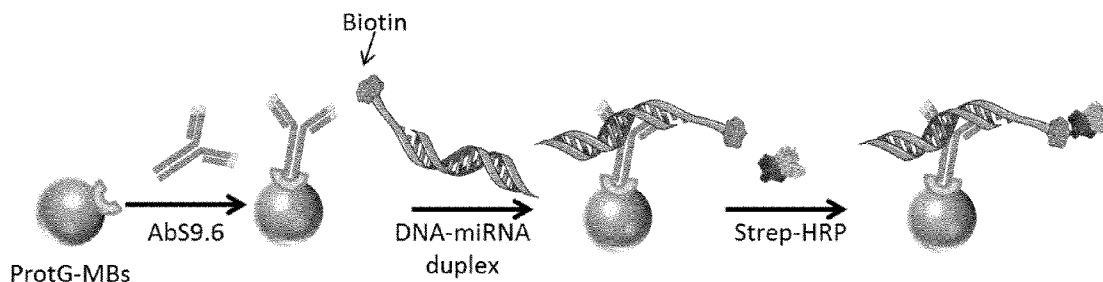
Feb. 9, 2016 (EP) 16382053.3

Publication Classification(51) **Int. Cl.****C12Q 1/6825** (2006.01)**C12Q 1/6804** (2006.01)(52) **U.S. Cl.**CPC **C12Q 1/6825** (2013.01); **C12Q 2600/178** (2013.01); **C12Q 1/6804** (2013.01)

(57)

ABSTRACT

The present invention is generally directed to methods for detecting and/or quantifying miRNA, RNA or DNA molecules of interest in at least one isolated biological sample. Basically the general procedure followed by the methods of the present invention involve four main steps: (i) homogeneous hybridization of the synthetic DNA or RNA probe and the target miRNA, RNA or DNA molecule of interest; (ii) capture of the resultant DNA/RNA, DNA/DNA or RNA/RNA duplex by the antibody-modified magnetic particles, preferably MBs, in solution; (iii) enzymatic labeling of the biotinylated DNA/RNA, DNA/DNA or RNA/RNA duplex captured onto the antibody-modified magnetic particles, preferably MBs and (iv) electrochemical detection of the modified-magnetic particles on an electrochemical sensor, preferably on screen-printed carbon electrodes (SPCEs).

Specification includes a Sequence Listing.



(51) International Patent Classification:

C12Q 1/68 (2018.01) C12Q 1/6804 (2018.01)

C12Q 1/6825 (2018.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2018/061037

(22) International Filing Date:

30 April 2018 (30.04.2018)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

17382231.3 28 April 2017 (28.04.2017) EP

17382750.2 08 November 2017 (08.11.2017) EP

(71) Applicant: MIRNAX BIOSENS, S.L. [ES/ES]; C/ Orense nº8, 1ª Planta, despacho 16, 28020 Madrid (ES).

(72) Inventors: PINGARRÓN, José Manuel; Universidad Complutense, Facultad de Ciencias Químicas, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES). CAMPUZANO, Susana; Universidad Complutense, Facultad de Ciencias Químicas, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES). RUIZ-VALDEPEÑAS-MONTIEL, Víctor; Universidad Complutense, Facultad de Ciencias Químicas, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES). TORRENTE RODRIGUEZ, Rebeca Magnolia; Universidad Complutense, Facultad de Ciencias Químicas, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES). VARGAS ORGAZ, Eva; Universidad Complutense, Facultad de Ciencias Químicas, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES). MONTOYA MIÑANO, Juan José; Universidad Complutense, Facultad de Medicina, Avda. Complutense S/N, 28040 Madrid (ES).

(74) Agent: FUSTER, GUSTAVO; HOFFMANN EITL S.L.U., Paseo de la Castellana 140. Planta 3ª., Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF NUCLEIC ACIDS

(57) Abstract: The present invention can be included in the medical field. The present invention provides a method for detecting and/or quantifying target miRNA, RNA or DNA molecules in an isolated sample. The method involves the steps of (a) contacting the isolated samples with a reagent mixture, (b) adding hydrogen peroxide (H₂O₂) and an electrochemical mediator molecule, (c) using a magnet to capture the mixture obtained in step (b) onto an electrochemical sensor and (d) detecting and/or quantifying an electrochemical signal produced by the complex of step (c). The present invention also provides a device/kit and a combination product which comprises components which are useful for detecting and/or quantifying target miRNA, RNA or DNA molecules. Accordingly, the present invention also provides the use of the aforementioned device/kit and combination product for the detection and/or quantification of miRNA, RNA or DNA molecules in an isolated sample.



10. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

1-m: 1-mismatch

3-IP: 3-indoxil fosfato

5-mCs: 5-metil citosinas

Ø: diámetro

A

A: adenina

AAs: autoanticuerpos

Ab S9.6: anticuerpo monoclonal de ratón S9.6

Ab: anticuerpo/antibody

Ab2: anticuerpo secundario

AbD: anticuerpo de detección

AE: electrodo auxiliar

Aff: affibody

AFP: alpha-fetoproteína

Ag–Ab: complejo antígeno–anticuerpo

AgNPs: nanopartículas de plata

Ago: proteína de la familia de las argonautas

AlcDH: enzima alcohol deshidrogenasa

anti-5-mC: anticuerpo específico a 5 metil-citosina

anti-CD105: anticuerpo específico de CD105

anti-FGFR4: anticuerpo específico de FGFR4

anti-HER-2: anticuerpo específico de HER-2

AP: enzima fosfatasa alcalina

AP₁: sonda auxiliar de DNA 1/auxiliary probe 1

AP₂: sonda auxiliar de DNA 2/auxiliary probe 2

APTES: 3-aminopropiltriethoxisilano

Aq: antraquinona

ASCO: Sociedad Americana de Oncología Clínica

ASLWV: voltamperometría lineal con redisolución aniónica

ATCP: fosfato de cadmio con plantilla de apoferritina

ATLP: fosfato de plomo con plantilla de apoferritina

Au: oro

AuE: electrodo de oro

AuNPs: nanopartículas de oro

AuNRs: nanovarillas de oro

B

b-Cp: sonda de captura biotinilada

b-H₁, b-H₂: sondas de DNA de tipo horquilla biotiniladas 1 y 2

Biotin/b-: biotina

Biotin-anti-FGFR4/b-anti-FGFR4: anticuerpo específico de FGFR4 conjugado con biotina

Biotin-Fbg: fibrinógeno conjugado con biotina

bp: pares de bases

BQ: *p*-benzoquinona

C

C: citosina

CA125: antígeno de cáncer 125

CA15-3: antígeno carbohidrato 15-3

CA19-9: antígeno de cáncer 19-9

CA27.29: antígeno de cáncer 27.29

CBD: dominio de unión a quitina/chitin binding domain

cDNA: DNA complementario

CEA: antígeno carcinoembrionario

cfDNA: DNA circulante extracelular/cell-free DNA

CILE: electrodo de carbono de líquido iónico

C_L: región constante de la cadena ligera de un anticuerpo

CMF: citometría de flujo

CNTs: nanotubos de carbono

CP: polímero conductor

Cp: sonda de captura

CTC: células tumorales circulantes

ctDNA: DNA circulante tumoral/circulating tumor DNA

CTES: carboxietil silanotriol

CV: voltamperometría cíclica

CYFRA-21-1: fragmento de citoqueratina 21-1

C_H: región constante de la cadena pesada de un anticuerpo

CHA: ensamblaje catalizado de secuencias tipo horquilla/catalytic hairpin assembly

ChOx: enzima colina oxidasa

D

DET: transferencia electrónica directa/direct electronic transfer

DFS: supervivencia libre de la enfermedad/disease free survival

DIG: digoxigenina

DNA: ácido desoxirribonucleico/deoxyribonucleic acid

DOPE: dioleoil fosfatidil etanolamina

DOTAP: 1, 2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano

Dp: sonda de detección

DPV: voltamperometría diferencial de impulsos

DR: rango dinámico/dynamic range

DSA: 5, 7-dinitro-2-sulfo-acridona

ds-DNA: DNA de doble cadena/double-stranded DNA

DSN: nucleasa específica a dúplex

E

E_{app}: potencial aplicado

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico/epidermal growth factor receptor

EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica/electrochemical impedance spectroscopy

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/enzyme-linked immunosorbent assay

ER: receptor de estrógeno

ERGO: óxido de grafeno reducido electroquímicamente

Estrep/Strep: estreptavidina/streptavidin

F

Fab: fragmento del anticuerpo de unión al antígeno

Fbg: fibrinógeno

Fc: fragmento cristizable del anticuerpo

Fcn: ferroceno

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos/Food and Drugs Administration

FET: transistor de efecto campo

FFPE: muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina

FGFR: receptores del factor de crecimiento de fibroblastos/fibroblast growth factor receptors

FGFR4: receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos

FISH: hibridación fluorescente *in situ*/fluorescent *in situ* hybridization

FITC: isotiocianato de fluoresceína

G

G: guanina

GA: glutaraldehído

GCE: electrodo vitrificado de carbono

GO: óxido de grafeno

GOx: enzima glucosa oxidasa

GPE: electrodo de lápiz de grafito

GST: glutatión-S-transferasa

H

H₁: secuencia tipo horquilla 1

H₂: secuencia tipo horquilla 2

Hb: hemoglobina

HCR: reacción de hibridación en cadena/hybridization chain reaction

HDA: amplificación dependiente de la helicasa/helicase-dependent amplification

HE4: proteína 4 del epididimo humano

HER-2 ECD: dominio extracelular de HER-2

HER-2: receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

His: histidina

His-Tag: cola de histidinas

HPV16: genotipo 16 del virus del papiloma humano

HPV18: genotipo 18 del virus del papiloma humano

HQ: hidroquinona

HRP: enzima peroxidasa de rábano

HRP-anti-HER-2/anti-HER-2-HRP: anticuerpo específico de HER-2 conjugado con peroxidasa

HRP-anti-MBP/anti-MBP-HRP: anticuerpo específico de MBP conjugado con peroxidasa

I

i: intensidad de corriente

IC₅₀: concentración que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo

ICP-OES: espectroscopía de emisión óptica con acoplamiento de plasma inductivo

IDE: microelectrodos interdigitados

Ig: inmunoglobulina

IgA: inmunoglobulina A

IgD: inmunoglobulina D

IgE: inmunoglobulina E

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IHC: inmunohistoquímica/immunohistochemistry

IL-6: interleucina-6

IL-8 mRNA: RNA mensajero asociado a la proteína IL-8

IL-8: proteína interleucina-8

ISH: hibridación *in situ*/*in situ* hybridization

ITO: óxido de indio y estaño

J

JAZ, ZNF346: proteína de dedo de zinc

K

Ki67: proteína Ki67

L

LD/LOD: límite de detección/limit of detection
 LNA: ácido nucleico bloqueado/locked nucleic acid
 lncRNAs: RNAs largos no codificantes/long non-coding RNAs
 LOx: enzima lactato oxidasa
 LPO: lactoperoxidasa
 LSV: voltamperometría de barrido lineal

M

mAb: anticuerpo monoclonal
 Mb: mioglobina
 MBP: proteína de unión a maltosa/maltose binding protein
 MBs: partículas magnéticas/magnetic beads
 MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
 MGCE: electrodo vitrificado de carbono magnético
 MGMT: O6-metilguanina-DNA metiltransferasa
 miRNA: micro-RNA
 mRNA: RNA mensajero
 MS: espectrometría de masas
 MWCNT: nanotubos de carbono de pared múltiple

N

NA: ácido nucleico/nucleic acid
 NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina
 Nb: nanoanticuerpo/nanobody
 NC: no complementario
 ncRNA: RNA no codificante/non-coding RNA
 nFIS: espectroscopía de impedancia no faradaica/non-Faradaic impedance spectroscopy
 NGS: secuenciación de nueva generación/next generation sequencing
 NHS: N-hidroxisuccinimida
 NPs: nanopartículas
 nts: nucleótidos

O

OCP: potenciometría de circuito abierto

o-MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados

OS: supervivencia global/overall survival

OVA1: antígeno de cáncer OVA1

P

p19: proteína viral p19

p53: proteína tumoral p53

p63: proteína tumoral p63

pAb: anticuerpo policlonal

PB: azul de prusia/prussian blue

PBNPs: nanopartículas de azul de prusia/prussian blue nanoparticles

PBS: disolución reguladora de fosfato

PBST: disolución reguladora de fosfato suplementada con Tween®20

PCR: reacción en cadena de la polimerasa/polymerase chain reaction

PEG: polietilenglicol

PF-4: factor plaquetario 4

pI: punto isoeléctrico

PLA: ensayo de proximidad/proximity ligation assay

PNA: ácido nucleico peptídico/peptide nucleic acid

PNIPAAm: poli (N-isopropil acrilamida)

POC/POCT: pruebas de diagnóstico en el punto de atención/point of care testing

polyA: poli-adeninas

PPyNPs: nanopartículas de polipirrol

PR: receptor de progesterona

pre-miRNA: miRNA precursor

pri-miRNA: transcritos primarios de miRNAs

ProtA: proteína A

ProtA-poly-HRP40/ProtA-poli-HRP40: proteína A conjugada a un homopolímero de 40 unidades de HRP

ProtG: proteína G

PSA: antígeno específico de próstata
 pSAM: monocapa autoensamblada polimérica
 PSMA: antígeno de membrana específico a próstata
 PtNPs: nanopartículas de platino

Q

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa/reverse transcription polymerase chain reaction

R

RASSF1A: isoforma A del gen efector de Ras/Ras association domain family 1 isoform A
 RCA: amplificación por círculo rodante/rolling circle amplification
 RE: electrodo de referencia
 RGO: óxido de grafeno reducido
 RISC: complejo de inducción de silenciamiento de RNA/RNA-induced silencing complex
 RNA: ácido ribonucleico/ribonucleic acid
 RNA_t: RNA total
 ROS: especies reactivas de oxígeno/reactive oxygen species
 rRNA: RNA ribosómico
 RSD: desviación estándar relativa

S

SAMs: monocapas autoensambladas/self-assembled monolayers
 SDA: amplificación por desplazamiento de cadenas/strand displacement amplification
 SDA-TWJ: amplificación por desplazamiento de cadena con cruce de tres vías
 sHER-2: fracción soluble extracelular de HER-2
 SiNWs: nanoalambres de silicio
 siRNA: RNA pequeño de interferencia/small interfering RNA
 SPAuEs: electrodo serigrafiado de oro
 SPCEs: electrodos serigrafiados de carbono
 SPdCEs: electrodos serigrafiados duales de carbono
 SPEs: electrodos impresos/screen-printed electrodes
 SPGE: electrodo serigrafiado de grafito

SPGNP: electrodo serigrafiado de oro modificado con nanopartículas de oro

ss-DNA: DNA de cadena sencilla/single-stranded DNA

ss-RNA: RNA de cadena sencilla/single-stranded RNA

Sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida/N-hydroxysulfosuccinimide

SWV: voltamperometría de onda cuadrada

T

T: timina

TAA: antígenos asociados al proceso tumoral

TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina

TDNs: nanoestructuras tetraédricas de DNA autoensambladas

Thi: tionina

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNBC: subtipo molecular de cáncer de mama triple negativo/triple negative breast cancer

TNF- α : factor de necrosis tumoral alpha

tRNA: RNA de transferencia

U

u.a.: unidades arbitrarias

U: unidad de actividad enzimática

U: uracilo

uPA/PAI-1: plasminógeno activador de urokinasa y su inhibidor

UV: ultravioleta

V

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular-C

V_H: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo

V_L: región variable de la cadena ligera de un anticuerpo

VIS: visible

W

WE: electrodo de trabajo/working electrode

Z

ZNF: proteínas de dedo de zinc